

2 ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

2.1 Явление люминесценции

При поглощении фотона электрон переходит на одну из свободных орбиталей (т.е. на новый энергетический уровень) и молекула оказывается в возбужденном состоянии. Таких уровней может быть несколько, и молекула может оказаться на любом из них, в зависимости от того, какой была длина волны действующего излучения (см. рис. 2.1).

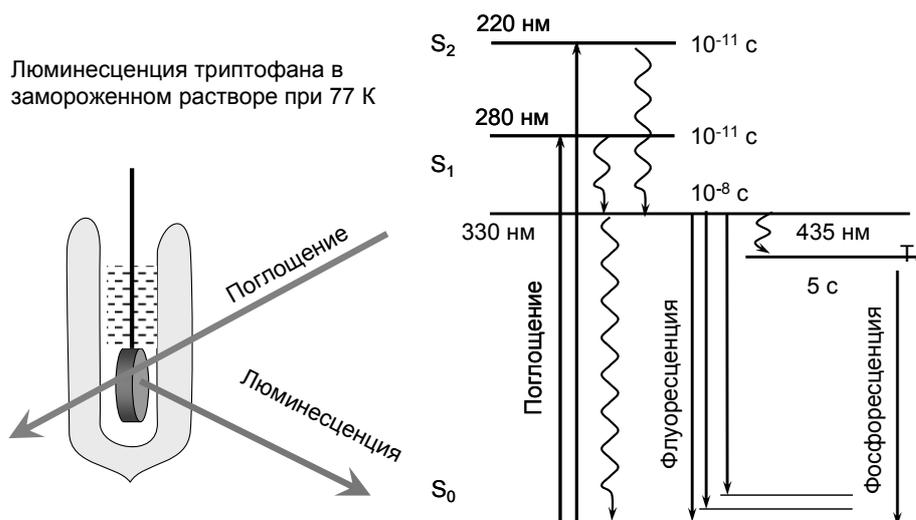


Рис.2.1. Электронные переходы в молекуле при поглощении света, флуоресценции и фосфоресценции.

Около возбужденных уровней (S₁, S₂, T) показано время жизни соответствующих состояний в секундах.

Обратный переход на основной уровень приводит к уменьшению энергии системы, которая может выделиться по частям, растратившись на колебательные движения ядер и поступательное движение молекул растворителя, т. е. теплоту, или же эта энергия возбужденного состояния может выделиться одной порцией в виде кванта люминесценции.

Важно отграничить явление люминесценции от других способов излучения света молекулами. По определению С. И. Вавилова, *люминесценцией тела в данной*

спектральной области называют избыток излучения над температурным при условии, что это избыточное излучение обладает конечной длительностью, превышающей период световых колебаний.

Образование электронно-возбужденных молекул может быть не только результатом поглощения ими квантов света, но и следствием химических реакций, электрического разряда и др. Поэтому в зависимости от источника энергии при возбуждении молекул говорят о разных типах люминесценции.

Люминесценцию, возникшую в результате освещения молекул, называют *фотолюминесценцией*. Свечение, сопровождающее химические реакции, называется *хемилюминесценцией* (слабая хемилюминесценция сопровождает, например, свободнорадикальное цепное окисление органических соединений, включая липиды). Многие живые организмы, например светляки, бактерии, некоторые морские организмы, способны испускать довольно сильный свет в результате реакций, катализируемых специфическими ферментами; такое свечение называют *биолюминесценцией*. В физике известны явления *термолюминесценции*, *электролюминесценции*, *сонолюминесценции*, *триболюминесценции*. Эти термины указывают на то, что причиной образования электронно-возбужденных молекул в этих случаях является нагревание образцов, пропускание электрического тока, воздействие ультразвуком, трение поверхностей.

2.2 Электронные переходы в возбужденной молекуле

В исходном (невозбужденном) состоянии молекулы находятся на самом нижнем из возможных энергетических уровней (см. рис. 2.1), т.е. на нижнем колебательном подуровне основного состояния. У органических молекул, имеющих систему сопряженных двойных связей, это состояние *синглетное*, при котором спины электронов на верхней заполненной орбитали (S_0) антипараллельны. Вероятность самопроизвольного перехода молекулы на более высокий энергетический уровень за счет тепловой энергии молекул зависит от разности в заселенности уровней, которая определяется уравнением Больцмана

$$\frac{n}{n_0} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (2.1)$$

где n_0 и n – число молекул в основном и возбужденном состояниях; ΔE – разность энергий уровней; k – постоянная Больцмана; T – абсолютная температура.

Например, в молекуле фенилаланина ΔE для ближайших колебательных подуровней $\cong 0,1$ эВ (при 300К $1\text{эВ} \cong 38 kT$). Отсюда находим, что $n/n_0 = 2,2\%$.

Заселенность вышележащих электронных уровней еще ниже, так как ΔE между уровнями больше. Таким образом, в состоянии теплового равновесия с окружающей средой

практически все молекулы находятся на самом нижнем колебательном подуровне самого нижнего электронного уровня.

Из основного состояния S_0 молекула может перейти на разные колебательные подуровни вышележащих электронных энергетических уровней возбужденного состояния S_1, S_2 и т. д., поглотив фотоны соответствующей энергии. Таким образом, длина стрелок вверх на рис. 2.1 отражает частоты и длины волн максимумов тонкой структуры спектров поглощения молекул по уравнениям:

$$E = h\nu \text{ и } \lambda = c/\nu \quad (2.2)$$

Обычно приходится решать обратную задачу: зная структуру спектра поглощения, строить схему электронных уровней. Пример такого построения приведен на рис. 2.2. Поглощение фотона происходит за время порядка 10^{-14} – 10^{-15} с, в течение следующих 10^{-11} – 10^{-12} с устанавливается тепловое равновесие возбужденной молекулы с окружающей средой. В состоянии равновесия относительная заселенность подуровней в возбужденном состоянии, как и в основном, определяется уравнением Больцмана. Поэтому фактически за 10^{-11} с происходит растрата части энергии возбужденного состояния на тепловое движение окружающих молекул (диссипация части энергии фотона в теплоту). На схеме рис. 2.1 это выглядит как переход возбужденной молекулы с разных колебательных подуровней на нижний колебательный подуровень нижнего из возбужденных состояний

В люминесцирующих молекулах возбужденное (синглетное) состояние относительно устойчиво: электрон может находиться на соответствующем уровне 10^{-9} – 10^{-8} с.

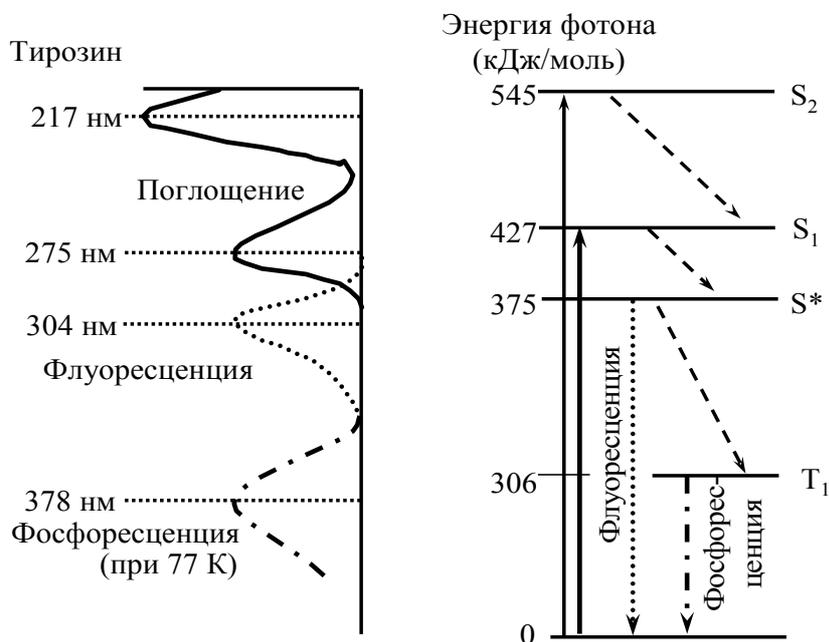


Рис.

2.2. Построение схемы энергетических уровней и электронных переходов по спектрам поглощения и люминесценции.

Слева: спектры поглощения и люминесценции в шкале энергий (или частот) фотонов, положения максимумов указаны в нанометрах; *справа:* энергетические электронные уровни.

2.2.1 Альтернативные пути растраты энергии возбуждения

В отсутствие переноса энергии на другие молекулы и фотохимической реакции обратный переход возбужденной молекулы в основное состояние может происходить тремя путями.

1. Электрон переходит с уровня возбужденного состояния S_1 на уровень основного состояния S_0 , при этом высвечивается квант света *флуоресценции*. Так как такой переход может происходить на разные колебательные подуровни основного состояния, то в спектре флуоресценции возможна тонкая структура, которая размывается в полярных растворителях.

2. Энергия возбужденного состояния растрчивается на тепловые движения молекул. Квант света при электронном переходе с возбужденного уровня на основной не высвечивается (переход молекулы с уровня S_1 на уровень S_0). Такой электронный переход

называют *безызлучательным*. На рис. 2.2 безызлучательные переходы показаны пунктирными стрелками.

3. Происходит обращение спина электрона. Молекула переходит в *триплетное* состояние T_1 , энергия которого несколько ниже энергии синглетного состояния S_1 . Поскольку прямой переход из триплетного состояния в основное синглетное запрещен, т. е. маловероятен, молекула может находиться в триплетном состоянии сравнительно длительное время от 10^{-4} с до нескольких секунд. При обычных температурах в жидкой фазе за это время происходит тепловая диссипация энергии возбужденного триплетного состояния – безызлучательный переход в основное состояние.

Но в растворах, замороженных жидким азотом, и даже при комнатных температурах, но в твердых образцах может наблюдаться излучательный переход $T_1 \rightarrow S_0$, сопровождающийся высвечиванием кванта *фосфоресценции*.

2.3 Законы люминесценции

Схема на рис. 2.1 позволяет объяснить эмпирические законы люминесценции, которые и послужили основой для создания самой схемы. Это *закон Стокса, правило Каши, правило Левинина, закон Вавилова*. Кратко остановимся на существовании этих законов.

2.3.1 Закон Стокса

Спектром люминесценции (флуоресценции или фосфоресценции) называют зависимость

$$I_l = f(\lambda),$$

где I_l – интенсивность света люминесценции в относительных единицах, измеренная при длине волны λ . Согласно закону Стокса, *спектр флуоресценции лежит в более длинноволновой области по сравнению со спектром поглощения того же соединения*. Это означает, что средняя энергия квантов флуоресценции меньше средней энергии поглощенных квантов. На рис. 2.1 данная закономерность проявляется в том, что длина прямых стрелок вверх (электронные переходы при поглощении света) в среднем больше длины стрелок, направленных вниз (электронные переходы при флуоресценции и фосфоресценции). Причина такого явления уже была рассмотрена выше – это превращение части энергии поглощенного фотона в тепловую энергию окружающих молекул.

2.3.2 Правило Каши

Правило Каши относится к форме спектра флуоресценции при возбуждении объекта светом разных длин волн. Испускание квантов флуоресценции всегда происходит с нижнего возбужденного уровня молекулы, независимо от того, на какой уровень был заброшен перед этим электрон в результате поглощения фотона. Это означает, что какой бы длиной волны ни была возбуждена молекула (разные вертикальные стрелки вверх на

схеме), излучение будет происходить из одного и того же состояния молекулы, и спектр флуоресценции во всех случаях будет одинаковым. Следовательно, *спектр флуоресценции (и фосфоресценции) не зависит от длины волны возбуждающего излучения.*

Правило Каши и закон Стокса имеют большое значение при проведении спектрофлуориметрических измерений. В соответствии с законом Стокса, для возбуждения люминесценции используют излучение с длинами волн, меньшими коротковолновой границы спектра флуоресценции. Благодаря этому рассеянный объектом возбуждающий свет может быть полностью убран при помощи светофильтров или монохроматора и не мешает регистрации люминесценции.

Если в растворе люминесцирует одно вещество, то на форме спектра люминесценции длина волны возбуждения не сказывается (правило Каши). Это позволяет использовать спектрофлуориметрию для качественного и количественного анализа люминесцирующих веществ.

2.3.3 Правило Левшина

Правило Левшина, называемое также *законом зеркальной симметрии*, утверждает, что *спектры флуоресценции по форме зеркально симметричны длинноволновой полосе спектра поглощения*, если они построены в шкале частот (энергий). Иллюстрацией этого правила могут служить спектры поглощения и флуоресценции антрацена, приведенные на рис. 2.3. Такое явление можно объяснить тем, что свойства молекулы, в частности расстояние между колебательными подуровнями и вероятности переходов на них, близки у молекул в основном и в электронно-возбужденном состояниях. Это говорит о том, что геометрия молекул в электронно-возбужденном состоянии мало изменяется по сравнению с основным состоянием. Более подробно вопрос рассмотрен в специальных руководствах.

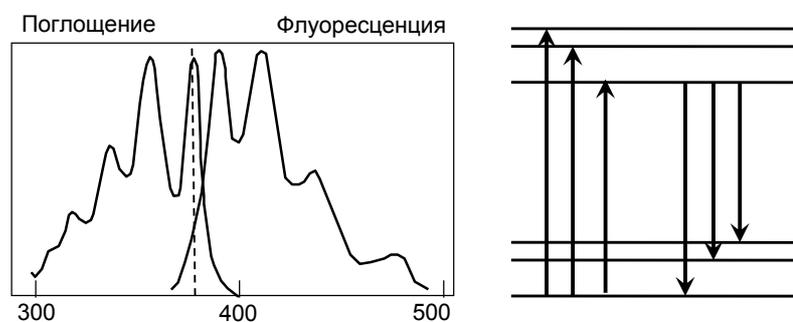


Рис. 2.3. Правило зеркальной симметрии спектров поглощения и флуоресценции (правило Левшина).

Слева: спектры; справа – электронные уровни и переходы.

2.3.4 Закон Вавилова

Закон Вавилова заключается в том, что *квантовый выход флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения люминесценции*. Квантовым выходом люминесценции называют отношение числа квантов, высвеченных в виде люминесценции, к числу поглощенных образцом квантов. Очевидно, что эта величина может принимать значения от 0 до 1.

От чего зависит квантовый выход? Поглощение кванта света в области основного электронного перехода приводит к образованию молекулы в возбужденном состоянии (см. рис. 2.1) т. е. в состоянии S_1 . Вероятность перехода молекулы из состояния S_0 в состояние S_1 при поглощении фотона равна единице и не зависит от длины волны поглощенного фотона. Излучательный переход молекулы с нижнего подуровня возбужденного состояния происходит с вероятностью η , меньшей единицы, и сопровождается высвечиванием кванта флуоресценции. Очевидно, что η и есть квантовый выход флуоресценции. Он меньше единицы, поскольку есть некоторая вероятность $(1 - \eta)$ безызлучательных переходов в основное состояние непосредственно или через триплетное состояние, а также других способов растраты энергии.

$$\eta = \frac{\text{Число квантов флуоресценции}}{\text{Число поглощенных квантов}} \quad (2.3)$$

Сущность закона Вавилова состоит в том, что на каком бы уровне возбужденного состояния ни оказалась молекула при поглощении фотона (а это зависит от длины волны возбуждающего света), вопрос о том, быть ли переходу излучательным или нет, решается только после того как молекула растратила часть энергии возбуждения в тепло (разную в разных случаях) и оказалась на нижнем колебательном подуровне нижнего уровня возбужденного состояния (где она находится дольше всего).

2.4 Связь интенсивности люминесценции с концентрацией вещества. Люминесцентный анализ

Качественный люминесцентный анализ основан на сравнении формы спектров исследуемой смеси веществ с формой спектра индивидуальных соединений, которые могут входить в состав изучаемой смеси. По причинам, изложенным ниже, необходимо использовать растворы с низкой оптической плотностью (например, меньше 0,1), в противном случае требуется учитывать эффекты экранировки и реабсорбции. Как и в случае абсорбционной спектрофотометрии, для идентификации флуоресцирующего вещества наибольшее значение имеют положение максимума, наличие и характер тонкой структуры спектров, полуширина полос флуоресценции. Важная особенность флуоресценции смеси нескольких соединений состоит в том, что спектр смеси изменяется при изменении длины волны возбуждения, поскольку при разных длинах волн могут преимущественно возбуждаться разные соединения.

Перейдем к количественному определению флуоресцирующего вещества в растворе. Предположим, что на кювету с раствором флуоресцирующего вещества падает монохроматический пучок света с мощностью I_0 Эйнштейн/с. Количество поглощенной световой энергии равно $I_0 \cdot (1 - T)$, где T – пропускание раствора. Из общего числа поглощенных фотонов часть, равная квантовому выходу флуоресценции η , высветится образцом в различных направлениях и во всей спектральной области люминесценции. Из этого общего светового потока с помощью светофильтров или монохроматора можно выделить и сфокусировать на приемник света световой поток, который будет зарегистрирован в виде фототока $I_{\text{люм}}$:

$$I_{\text{люм}} = K \cdot I_0 \cdot (1 - T) \cdot \eta \quad (2.4)$$

Таким образом, интенсивность люминесценции $I_{\text{люм}}$ пропорциональна интенсивности возбуждающего света I_0 , квантовому выходу люминесценции η , коэффициенту поглощения света $(1 - T)$. Коэффициент пропорциональности K зависит от телесного угла, в пределах которого собран свет люминесценции, ширины вырезаемой монохроматором или светофильтром спектральной области, пропускания монохроматора или светофильтра и чувствительности приемника света.

(рис. 2.4).

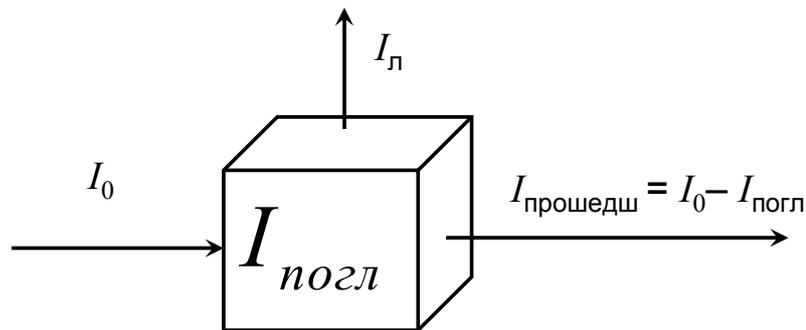


Рис. 2.4. К выводу уравнения количественного люминесцентного анализа. (Объяснение в тексте)

Важно получить зависимость интенсивности измеряемой люминесценции от концентрации и свойств люминесцирующего вещества, для чего выразим светопропускание через концентрацию и молярный коэффициент поглощения:

$$I_{\text{люм}} = K\eta I_0 (1 - 10^{-\epsilon lc}) \quad (2.5)$$

Разложим полученную степенную функцию в ряд; при малых значениях $\epsilon lc < 0,05$ можно пренебречь высшими членами ряда и получить окончательное выражение для количественного люминесцентного анализа:

$$I_{\text{люм}} = 2,303K\eta I_0 \varepsilon lc \quad (2.6)$$

Итак, при низких оптических плотностях растворов интенсивность люминесценции пропорциональна концентрации флуоресцирующего вещества. На этом основан количественный флуоресцентный анализ. Необходимо иметь стандартный раствор определяемого соединения с известной концентрацией C_s ; измеряют интенсивность флуоресценции такого раствора I_{es} и интенсивность флуоресценции исследуемого раствора I_{ex} . Концентрация вещества в исследуемом растворе C_x легко определяется из соответствующей системы уравнений.

2.5 Спектры возбуждения люминесценции

Если возбуждение люминесценции осуществляется монохроматическим светом, выделяемым с помощью монохроматора, то появляется возможность измерить зависимость интенсивности люминесценции от длины волны возбуждающего света. Характер этой зависимости ясен из уравнения (2.4).

Поскольку квантовый выход флуоресценции для конкретного флуоресцирующего вещества, согласно закону Вавилова, от длины волны возбуждения не зависит (равно как и константа K), ясно, что форма спектра возбуждения повторяет форму зависимости от длины волны коэффициента поглощения, т. е. функции $(1 - T) = f(\lambda)$

Для образцов с низкой оптической плотностью уравнение (2.4) переходит в уравнение (2.6). Так как K и η – постоянные, то можно сказать, что *спектр возбуждения флуоресценции в разбавленных растворах совпадает (по форме) со спектром поглощения флуоресцирующего соединения*.

2.6 Приборы для регистрации люминесценции

2.6.1 Флуориметр со светофильтрами

Одно из достоинств метода регистрации люминесценции заключается в том, что для решения многих биологических задач не требуется использование сложных и дорогих приборов. Если не требуется проведения точных спектральных измерений или применения техники исследования быстро протекающих процессов, а требуется измерить интенсивность флуоресценции при возбуждении и регистрации в относительно широкой области спектра, то можно использовать простейший флуориметр со светофильтрами.

При измерении люминесценции существенным является выбор светофильтров, необходимых для разделения света, возбуждающего люминесценцию, и света люминесценции. Светофильтр для возбуждения люминесценции должен пропускать свет только в области поглощения исследуемого вещества и не должен пропускать свет в области, в которой образец люминесцирует. Светофильтр для люминесценции должен пропускать люминесценцию, но возбуждающий свет должен полностью им поглощаться.

Подбирая такую пару светофильтров, следует добиваться их хорошей *скрещенности*: сложенные вместе эти два светофильтра совсем не должны пропускать свет (рис. 2.5).

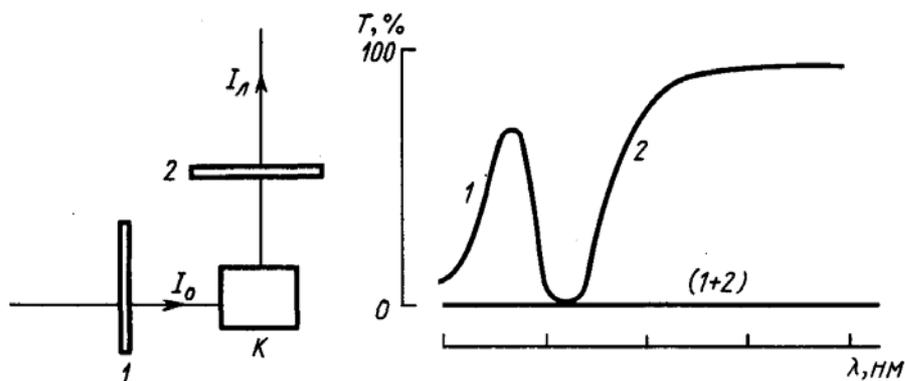


Рис. 2.5. Использование скрещенных светофильтров для измерения люминесценции: K – кювета с образцом; 1 и 2 – светофильтры; (1 + 2) – спектр пропускания скрещенных фильтров. Слева: схема прохождения света; справа: спектры пропускания светофильтров.

При перестановке скрещенных светофильтров фототок фотоэлемента или фотоумножителя, обусловленный люминесценцией, должен исчезать (закон Стокса!). В эксперименте иногда целесообразно произвести небольшие доработки заводского прибора, такого как флуориметр, которые позволяют резко расширить его возможности. Например, установив одну поляроидную пленку на пути возбуждающего света перед кюветой и используя две сменные поляроидные пленки после кюветы, можно измерять также величины *поляризации люминесценции*. Можно изучать *кинетику* процесса, пользуясь проточными кюветами или добавляя растворы в кювету, снабженную мешалкой..

2.6.2 Спектрофлуориметры

Спектрофлуориметры предназначены для регистрации спектров люминесценции или спектров возбуждения люминесценции. В идеале спектрофлуориметр состоит из двух монохроматоров; один – для выделения монохроматического возбуждающего света, другой – для измерения спектра люминесценции (рис. 2.6). Коммерческие приборы, как правило, снабжены кварцевыми кюветами толщиной 1 см, угол между направлениями возбуждения и люминесценции равен 90° .

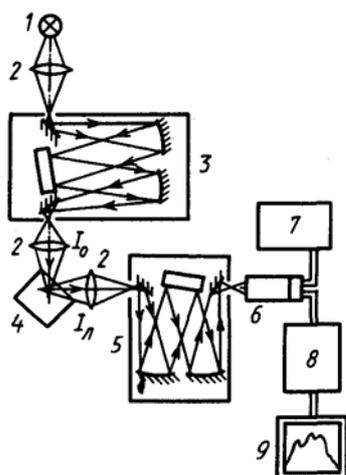


Рис. 2.6. Схема спектрофлуориметра: 1 – лампа; 2 – линзы; 3 и 5 – монохроматоры; 4 – кювета с образцом; 6 – ФЭУ; 7 – блок питания ФЭУ; 8 – усилитель; 9 – самописец; I_0 – возбуждающий свет; I_l – люминесценция образца.

Такое расположение направления возбуждающего пучка и измеряемого света люминесценции позволяет собирать значительную часть света люминесценции и, что не менее важно, исключить люминесценцию самой кюветы, так как флуоресценция стенок не попадает на фотоприемник. Однако эта конструкция предполагает измерение образцов с малой оптической плотностью, которые к тому же не слишком сильно рассеивают свет. В образцах с высокой оптической плотностью светится только тонкий слой раствора, примыкающий к передней стенке кюветы, и описанный прибор измеряет лишь малую часть света люминесценции. Чтобы избежать этого, в случае образцов с высокой оптической плотностью нужно использовать тонкие кюветы, а измерение флуоресценции проводить с той стороны кюветы, на которую падает возбуждающее излучение.

При измерении растворов с малой оптической плотностью такая схема измерения спереди не дает преимущества по сравнению с измерением сбоку, поскольку флуоресценция кюветы регистрируется вместе с флуоресценцией раствора и, следовательно, возрастают требования к материалу кювет. Зато увеличение оптической плотности образца в этом случае не сопровождается снижением интенсивности измеряемой люминесценции (рис. 2.7).

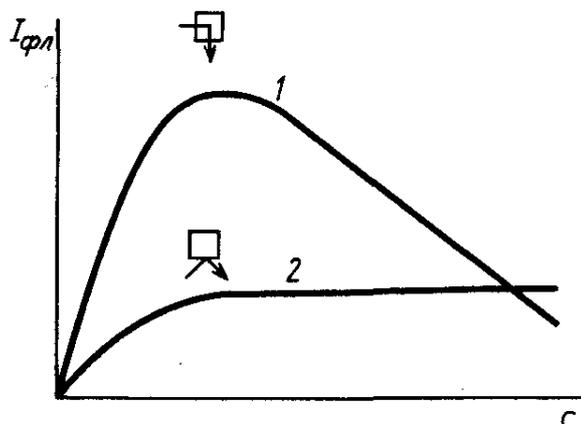


Рис. 2.7. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации вещества при регистрации с боковой (1) и с передней (2) стенки кювет.

При измерениях слабой люминесценции возрастают требования к светосиле спектральных приборов, чувствительности приемника света, отсутствию рассеянного света в монохроматоре. Особое внимание следует обращать на возможную люминесценцию кюветы, растворителя и примесей к реактивам.

2.7 Поляризация флуоресценции

Измерение поляризации люминесценции получило широкое применение, поскольку оно позволяет изучать вращательную подвижность частиц в данной среде под действием тепловых соударений с окружающими молекулами.

Как известно, электромагнитное излучение представляет собой поперечные колебания электрического и магнитного векторов во взаимно перпендикулярных плоскостях. В обычном деполаризованном свете существует множество хаотично расположенных плоскостей колебания векторов. При помощи специальных поляризаторов (призмы или поляроидной пленки) можно выделить одну плоскость колебания вектора электрического поля и таким образом получить *плоскополяризованный свет*. Чтобы убедиться в том, что свет действительно поляризован, нужно использовать второй поляризатор и измерять интенсивность света, который он пропускает при разных углах его поворота. При одном положении интенсивность света будет максимальной, при другом – нулевой. При неполной поляризации света мы не получим нулевой интенсивности в минимуме.

Степень поляризации светового потока можно охарактеризовать коэффициентом поляризации. Введем его определение. Для этого рассмотрим два поляризатора с плоскостями поляризации, расположенными под некоторым углом друг к другу (рис. 2.8). Будем измерять интенсивность поляризованного света в зависимости от угла расположения поляризаторов. Очевидно, что при параллельном расположении плоскостей поляризации света двумя поляризаторами интенсивность света будет максимальной (I_{\parallel}), а

при перпендикулярном расположении – минимальной (I_{\perp}). Величина $P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$

называется *коэффициентом поляризации*. Если $I_{\perp} = 0$, то коэффициент поляризации будет равен 1.

Как измеряют поляризацию флуоресценции? Рассмотрим рис. 2.8. Возбуждающий свет (I) проходит через поляризатор (2). Поляризованный свет возбуждает молекулы образца (3), в результате происходит излучение флуоресценции, которая тоже может быть поляризована. Излучение проходит через второй поляризатор, который называется анализатором (4). Анализатор вращают, измеряя I_{\perp} и I_{\parallel} . Затем рассчитывают коэффициент поляризации P .

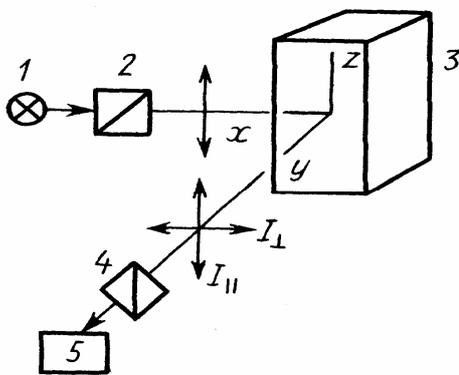


Рис. 2.8. Схема регистрации поляризации флуоресценции: 1 — источник света, 2 — поляризатор, 3 — образец, 4 — анализатор, 5 — детектор.

Важно, что возбуждение плоскополяризованным светом максимально эффективно для тех молекул, вектор электронного перехода в которых находится в плоскости поляризации возбуждающего света, т.е. параллелен электрическому вектору электромагнитных колебаний. Флуоресценция таких молекул будет сильно поляризована. Теоретически для идеального случая, когда векторы электронных переходов при поглощении и флуоресценции полностью совпадают по направлению, максимально возможный коэффициент поляризации флуоресценции равен 0,5. Такая величина никогда не реализуется по разным причинам. В частности, деполяризация флуоресценции происходит в результате того, что в результате вращения молекулы вектор электронного перехода меняет свое направление за время от момента возбуждения до момента испускания молекулой кванта флуоресценции (т.е. за время жизни возбужденного состояния молекулы). По этой причине флуоресценция низкомолекулярных соединений, растворенных в воде или спирте, всегда полностью *деполяризована*. Но она поляризована при растворении тех же веществ в средах с высокой вязкостью, например, в глицерине.

На этом явлении основан способ определения вязкости среды, окружающей флуоресцирующие молекулы, например, вязкость липидного слоя мембран, в котором

растворен флуоресцирующий краситель (флуоресцентный зонд). Принцип этого метода заключается в следующем. Сначала измеряем коэффициент поляризации достаточно гидрофобного флуоресцентного зонда в нашем объекте (например, в суспензии клеток или митохондрий). Затем проводим серию измерений поляризации флуоресценции зонда, растворенного в смесях глицерина с водой, обладающих различной вязкостью, которую мы измеряем обычным вискозиметром. Для водного раствора флуоресцирующего вещества коэффициент поляризации при комнатной температуре равен нулю. Измеренный в тех же условиях для глицеринового раствора, он оказывается равным, скажем, 0,3. Определив коэффициенты поляризации для нескольких промежуточных точек – водно-глицериновых смесей флуоресцирующего вещества – можно построить калибровочную кривую: зависимость коэффициента поляризации P от вязкости. По этой кривой легко найти микровязкость мембраны в окружении зонда, зная коэффициент поляризации флуоресценции зонда в мембране.

2.8 Перенос энергии электронного возбуждения

В определенных условиях может происходить перенос энергии электронного возбуждения от молекулы, которая поглотила световую энергию (и которую мы назовем *донором*), на молекулу другой молекулы того же самого или другого вещества, которая при этом переходит в электронно-возбужденное состояние (ее мы назовем *акцептором* энергии). Полученную энергию молекула акцептора может испустить в виде кванта люминесценции либо использовать в фотохимической реакции, либо, наконец, просто растратить в тепло. На рис. 2.9. приведена схема процессов, происходящих при процессе передачи энергии от донора (D) к акцептору (A). На первом этапе молекула донора поглощает фотон ($h\nu_{Da}$), образуя возбужденную молекулу донора D^* . Возбужденная молекула донора может высветить фотон ($h\nu_{Df}$) (флуоресценция донора). В присутствии акцептора может происходить возбуждение молекулы-акцептора в результате переноса энергии с донора с последующей флуоресценцией акцептора ($h\nu_{Af}$) (рис. 2.9).

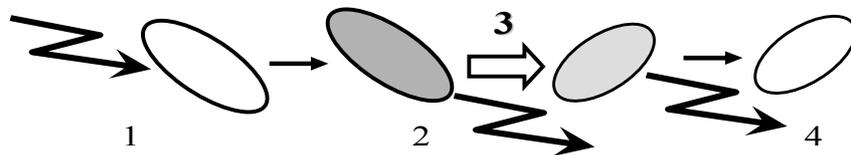
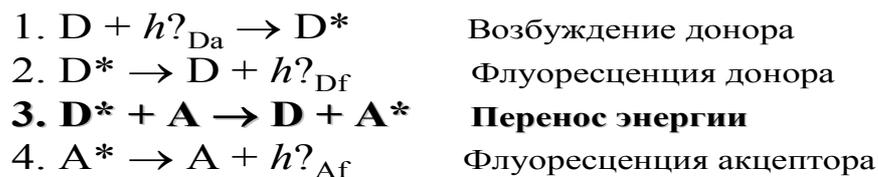


Рис. 2.9. Схема передачи энергии от донора к акцептору.

1-4 – этапы процесса передачи (пояснение в тексте)

Из данной схемы ясно, что методом изучения переноса энергии обычно служит измерение флуоресценции донора и акцептора в их смеси. Допустим, в изучаемой системе присутствует донор, характеризующийся своими спектрами возбуждения и люминесценции (рис. 2.10А) и акцептор со своими характерными спектрами (2.10Б). При возбуждении системы светом, соответствующим возбуждению донора, мы будем видеть флуоресценцию как донора, так и акцептора (рис. 2.10В) в случае частичного переноса энергии. Если переноса энергии не будет, то в спектре будет только полоса люминесценции донора. При полном переносе энергии на акцептор в спектре будет только полоса люминесценции акцептора (рис. 2.10Г).

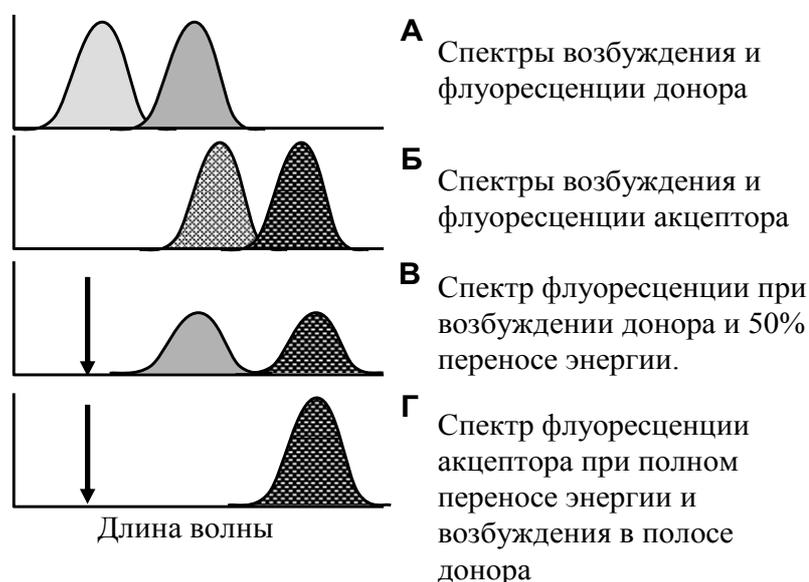


Рис. 2.10. Люминесцентный метод – инструмент для изучения механизмов переноса энергии.

При помощи этого явления можно изучать расстояния между молекулами донора и акцептора в системе, поскольку перенос энергии происходит только при сближении молекул на определенное расстояние. Согласно теории Ферстера и Вавилова в основе переноса энергии лежит взаимодействие между диполем и индуцированным диполем, сила которого резко падает с увеличением расстояния (обратно пропорциональна

расстоянию в шестой степени). Уравнение зависимости эффективности W такого индуктивно-резонансного переноса энергии от расстояния между молекулами R называется уравнением Ферстера:

$$W = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6} \quad (2.7)$$

где R_0 – радиус Ферстера, расстояние между молекулами донора и акцептора, при котором вероятность переноса энергии равна 50%.

2.9 Некоторые другие примеры применения люминесценции

Основные области применения люминесценции можно суммировать в виде перечня из 11 пунктов (см. ниже). Первые три из них основаны непосредственно на люминесцентном анализе – определении концентрации люминесцирующих веществ в зависимости от интенсивности излучения. Остальные методы основаны на применении специальных веществ – флуоресцентных меток (химически прикрепленных химических групп) и зондов (несвязанных веществ, находящихся в среде).

1. Анализ количества природных соединений по их флуоресценции,
2. Анализ веществ по образованию их флуоресцирующих производных,
3. Исследование проницаемости гематоэнцефалического и гистогематического барьеров по флуоресценции флуоресценина,
4. Иммуный анализ при помощи флуоресцентных меток, присоединенных к антигену или к антителу,
5. Исследование доступности внутренней области белков для кислорода по фосфоресценции триптофановых остатков при обычных температурах,
6. Изучение вращательной подвижности зондов внутри белков или липидной фазы мембран по поляризации флуоресценции,
7. Изучение поступательной диффузии пирена в мембранах с помощью измерения его эксимеризации,
8. Измерение расстояния между группами с помощью переноса энергии,
9. Изучение биопотенциалов, используя распределение заряженных зондов по сторонам мембраны,
10. Флуоресцентная микроскопия (в том числе конфокальная микроскопия),
11. Флуоресцентная эндоскопия .

2.9.1 Качественный и количественный анализ природных флуоресцирующих соединений

В природе существует довольно много веществ, обладающих собственной флуоресценцией. Разумеется, веществ, обладающих поглощением, существенно больше, но, во-первых, люминесцентные методы более селективны (как раз в силу ограниченного количества люминесцирующих веществ), а, во-вторых, гораздо более чувствительны. Причина этого заключается в физической основе измерения аналитического сигнала. Пропускание – это *доля*, света, прошедшего через раствор. При поглощении света очень разбавленным раствором измеряются приблизительно равные интенсивности падающего и прошедшего света, и отношение двух очень близких величин определяется с большой погрешностью. В люминесцентных методах измеряют *абсолютное значение* сигнала, которое даже при малых количествах определяемого вещества можно надежно определить при помощи различных технических приемов. По этой причине измерение люминесценции – исключительно чувствительный метод обнаружения и количественного определения люминесцирующего вещества в биологическом образце. Так, например, при использовании обычного флуориметра можно измерить концентрацию флуоресцеина до 10^{-15} М в биологических жидкостях при объеме пробы 0,2–0,3 мл. После разделения методом бумажной хроматографии непосредственно на хроматограмме можно определять микроколичества таких веществ, как серотонин или флавиннуклеотиды.

Можно привести тысячи примеров применения люминесцентного анализа в биологии и медицине. Порфирины, хлорофилл и его производные, флавины, пуриновые и пиримидиновые основания, нуклеиновые кислоты, ароматические аминокислоты, белки, а также многие другие биологически важные соединения, содержащие ароматические и гетероциклические кольца с системой сопряженных двойных связей обладают более или менее выраженной люминесценцией, которая используется для количественного анализа этих соединений. Например, широко распространены флуориметрические методы определения флавинов и НАД-Н при исследованиях фотосинтеза и окислительных процессов в клетке. Изменения люминесценции – не только чувствительный, но и селективный метод, что важно при анализе веществ в смеси. Спектры люминесценции и спектры возбуждения люминесценции различны у разных соединений; это позволяет определять концентрацию того или иного компонента на фоне люминесценции других веществ.

2.9.2 Анализ образующихся или разрушающихся флуоресцирующих веществ

Часто в люминесцентном анализе используют люминесценцию не природных, а искусственно созданных люминесцирующих веществ. Приведем пример из активно развивающейся области исследования – свободные радикалы и окислительный стресс. Есть много различных способов проследить за последствиями действий свободных

радикалов в клеточных системах. Паринариевая кислота, представитель класса жирных кислот, обладает системой сопряженных связей и собственной флуоресценцией. При окислении этой кислоты кислородом флуоресценция исчезает. Исчезновение флуоресценции паринариевой кислоты служит для обнаружения повреждающего действия радикалов на липиды мембран, поскольку паринариевая кислота входит в состав фосфолипидов.

2.9.3 Изучение проницаемости гематоэнцефалического барьера

С помощью измерения люминесценции была подтверждена гипотеза о нарушении гематоэнцефалического барьера под действием радиации. Подопытным мышам вводили в кровь водорастворимое вещество флуоресцеин, которое в норме не пропускать через гематоэнцефалический барьер. После облучения животных, анализ мозговой ткани после соответствующей пробоподготовки выявил наличие в ней флуоресцеина. Были построены и зависимости степени нарушения от дозы облучения.

2.9.4 Иммунофлуоресцентный анализ

Современные методы иммунохимии первоначально были основаны главным образом на измерении радиоактивности изотопно-меченных антигенов или антител. Однако можно заменить радиоактивные изотопы флуоресцирующими веществами, которые ковалентно «пришиваются» к молекуле антигена или антитела. Важно только, чтобы введение такой *флуоресцентной метки* не привело к изменению иммунных свойств компонентов системы. Достоинство иммунофлуоресцентной техники заключается в том, что при сохранении достаточно высокой чувствительности нам не приходится подвергать себя опасности получения известной дозы ионизирующей радиации.

2.9.5 Доступность внутренних областей белковых молекул и биологических мембран для молекул кислорода

Этот метод основан на измерении фосфоресценции – длительного свечения в результате перехода с возбужденного триплетного на основной синглетный уровень. Поскольку время жизни возбужденного состояния (и, следовательно, длительность свечения) довольно велико (до единиц секунд), фосфоресценция чувствительна к воздействию различных факторов, в частности, наличию *тушителей*. Самым распространенным и весьма эффективным тушителем фосфоресценции является молекулярный кислород. Молекула кислорода, во-первых, дезактивирует триплетное состояние, а во-вторых, при диффузии молекула кислорода многократно сталкивается с фосфоресцирующей молекулой, вызывая тушение люминесценции. В присутствии кислорода фосфоресценция практически не проявляется, и на этом, в частности, основан очень чувствительный метод определения кислорода в тканях и жидкостях.

Фосфоресценцию удобнее измерять, чем флуоресценцию благодаря существенно большей длительности послесвечения – измерения можно проводить и спустя какое-то время

после возбуждения. Для этого существуют разного рода фосфороскопы; принципиальная схема простейшего фосфороскопа дана на рис. 2.11. Кювету с раствором окружает вращающийся цилиндр с прорезью. Меняя скорость вращения цилиндра, можно исследовать кинетику затухания фосфоресценции.

Механические устройства в последнее время вытесняются электронными. При этом используются лазеры, дающие очень короткие импульсы света, и электронные системы, включающие измерение света лишь после прекращения освещения объекта лазерным импульсом. И импульсы, и включение измерения света могут регулярно повторяться с определенной частотой для накопления сигнала (стробоскопический режим).

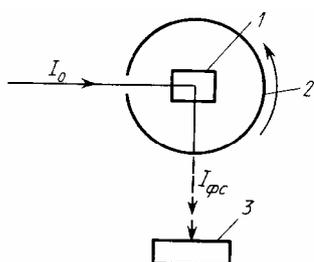


Рис. 2.11. Фосфороскоп:

1 — кювета, 2 — вращающийся цилиндр с прорезями, 3 — детектор, I_0 — возбуждающее излучение, $I_{\phi c}$ — детектируемая фосфоресценция.

2.9.6 Измерение микровязкости по степени эксимеризации пирена

Пирен способен образовывать *эксимеры* — неустойчивые комплексы молекул, одна из которых находится в электронно-возбужденном состоянии (см. рис. 2.12).

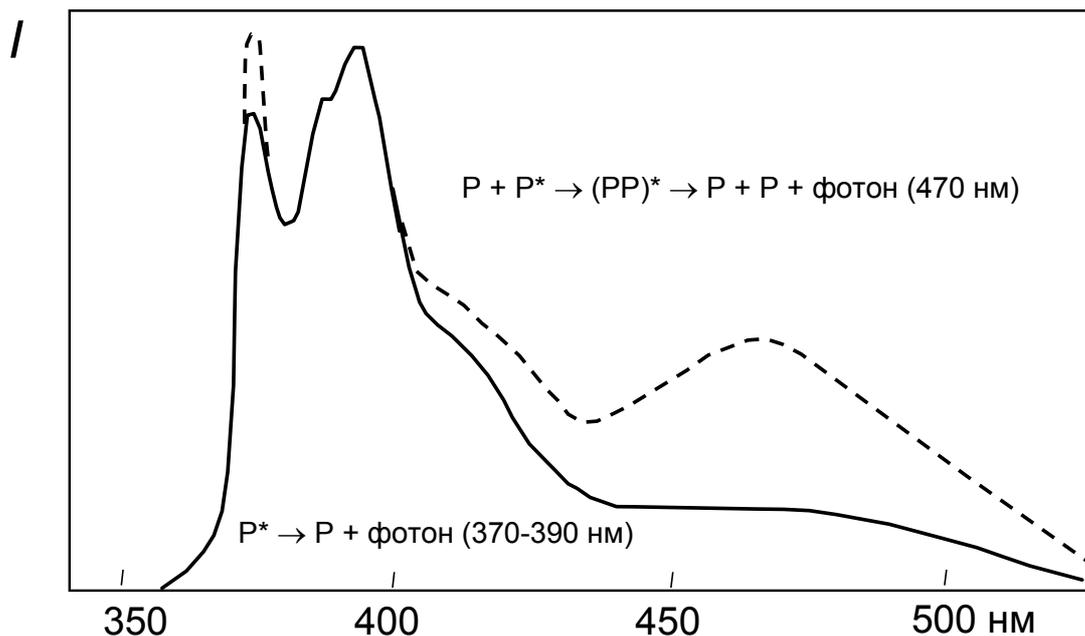


Рис. 2.12. Спектры флуоресценции мономера (сплошная линия) и эксимера (пунктирная линия) пирена (P).

При поглощении фотона молекула пирена P переходит в возбужденное состояние P*. Судьба этой возбужденной молекулы может быть разной: она может испустить фотон с длиной волны 370–390 нм, а может присоединить другую невозбужденную молекулу пирена с образованием эксимера. Эксимер тоже способен высветить фотон, но с иной длиной волны (470 нм), распадаясь при этом на две невозбужденные молекулы пирена. Измерение образования эксимеров основано как раз на том, что длина волны люминесценции эксимера существенно отличается от длины волны люминесценции мономера.

Процесс образования эксимера зависит от вязкости среды. Тем больше вязкость, тем меньше скорость движения молекул и, соответственно, меньше вероятность столкновения молекул и образования комплекса за время жизни возбужденного состояния. Таким образом, флуоресценция эксимера наблюдается в среде с низкой вязкостью (высокой текучестью), а в вязкой среде основная флуоресценция принадлежит мономерам пирена. Определяя интенсивность флуоресценции при соответствующих длинах волн, можно определить микровязкость среды.

В качестве примера применения этого очень эффективного метода можно привести определение вязкости липопротеинов крови. Как известно, наличие в крови

липопротеинов высокой плотности является фактором риска развития атеросклероза, особенно у пожилых людей.

2.9.7 Распределение заряженных зондов между водной фазой и липидным слоем мембран

Флуоресцентным зондом называют флуоресцирующую молекулу, которая связывается с белками, биологическими мембранами или другими компонентами клетки нековалентными связями. В качестве зондов используют соединения, параметры люминесценции которых резко меняются в зависимости от свойств среды. Поэтому, зная локализацию зонда в клетке, можно по люминесценции судить о физических свойствах непосредственного микроокружения молекул зонда, т. е. о свойствах белков, мембран, нуклеиновых кислот и других структур клеток.

В некоторых случаях компоненты клеток (например, белки, жирные кислоты и т. д.) ковалентно связывают (метят) с флуоресцирующими соединениями, в этих случаях используют термин *флуоресцентные метки*.



Рис. 2.13. Формулы некоторых флуоресцентных зондов.

На рис. 2.13. показаны формулы некоторых широко используемых флуоресцентных зондов. Молекула 1-анилинонафтален-8-сульфоната (АНС) заряжена, поэтому этот зонд весьма чувствителен к наличию электрического поля. Молекулы 3-метоксибензантрона (МБА) и диметиламинохалкона не заряжены, но обладают значительным дипольным моментом, который меняется при поглощении света.

Рассмотрим пример изучения липидного слоя мембран с помощью зонда АНС. Будучи включенным в липидный слой мембран, краситель показывает довольно высокий квантовый выход флуоресценции ($p=0,29$ и $\tau=7,0$ нс). При переходе красителя из водной в мембранную фазу квантовый выход флуоресценции АНС возрастает на ~ 2 порядка. В

суспензии мембран флуоресценция красителя обусловлена практически только той его частью, которая связалась с мембранами (встроилась в липидный слой); это позволяет изучать связывание с липидами (и белками) мембран АНС, который может считаться люминесцентным зондом на наличие гидрофобной фазы.

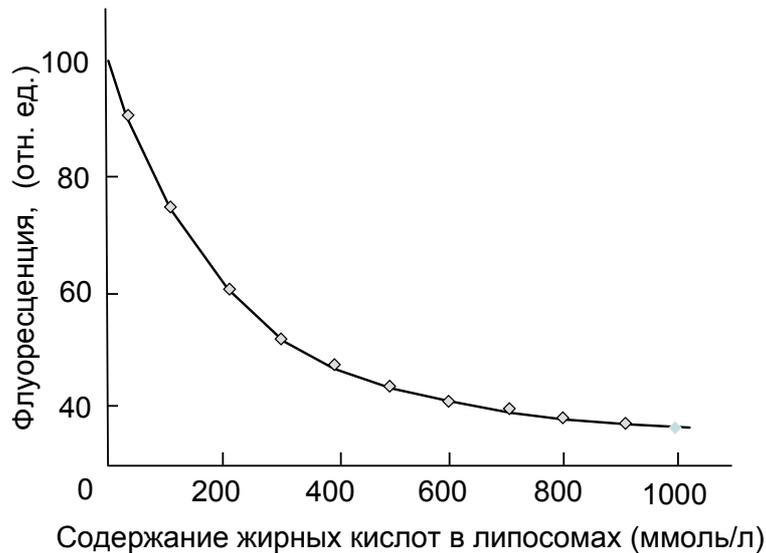


Рис. 2.14. Влияние заряда на мембране на флуоресценцию зонда АНС.

При увеличении содержания жирной кислоты в липидном бислое мембрана приобретает отрицательный заряд.

Но, поскольку АНС имеет отрицательный заряд, его связывание с мембранами зависит от поверхностного заряда мембран: с ростом положительного заряда связывание растет, с ростом отрицательного падает. Тем самым АНС можно использовать также и в качестве зонда на наличие заряда на мембранах и на белковых макромолекулах (рис. 2.14).

2.9.8 Измерение мембранного потенциала

Заряженные флуоресцентные красители распределяются между клеткой и окружающей средой, а также между митохондриями и внутриклеточным пространством в соответствии с разностью потенциалов между этими фазами, которые разделены изолятором – клеточной и внутриклеточными мембранами. Например, заряженный цианиновый краситель Dis-C3-(5) накапливается в митохондриях при появлении отрицательного потенциала в матриксе в результате переноса протонов в ходе окисления субстратов дыхания. В матриксе краситель не флуоресцирует, а в окружающей среде обладает сильной флуоресценцией. Поэтому энергизация митохондрий, т.е. появление отрицательного зпотенциала внутри матрикса сопровождается тушением флуоресценции красителя в митохондриальной суспензии. Используя этот прием был определен

потенциал на митохондриальной мембране и его изменение при повреждении митохондрий.

2.9.9 Оценка полярности среды в окружении флуоресцентного зонда

Рассмотрим еще два очень распространенные зонда – МБА и диметиламинохалкон (ДМХ). Молекулы этих соединений обладают значительным дипольным моментом. Соответственно, вокруг этих молекул определенным образом ориентируются молекулы воды (рис. 2.15.1). В момент поглощения света дипольный момент увеличивается но ориентация молекул растворителя остается той же (рис. 2.15.2). Далее происходит перестройка молекул воды (сольватация), требующая определенной энергии (рис. 2.15.3), в результате чего энергия системы уменьшается. При излучении кванта флуоресценции происходит уменьшение дипольного момента (рис. 2.15.4). Дальнейшее уменьшение энергии происходит в результате очередной переориентации молекул растворителя (волнистая стрелка от 4 к 1). В итоге, сольватация молекулы в возбужденном состоянии приводит к увеличению длины волны флуоресценции по сравнению с тем случаем, когда сольватация отсутствует.

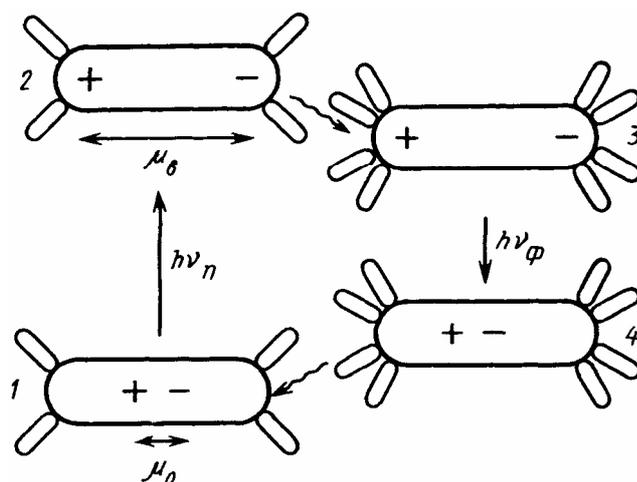


Рис. 2.15. Изменение дипольного момента и сольватации флуоресцентного зонда ДМХ после поглощения фотона ($h\nu_n$) или испускания фотона флуоресценции ($h\nu_\phi$).

Большими и малыми овалами схематически обозначены молекулы ДМХ и сольватирующего растворителя; μ_0 - дипольный момент молекулы в основном состоянии; μ_v - дипольный момент молекулы в возбужденном состоянии; 1-4 – последовательные стадии изменения дипольного момента в результате поглощения света и сольватации.

Дипольный момент при возбуждении может изменяться в любую сторону как по величине, так и по направлению, однако обычно он возрастает, и происходит сдвиг спектра флуоресценции в длинноволновую область. Очевидно, что этот сдвиг спектра будет выше при следующих условиях: а) большое значение разности дипольных моментов в невозбужденном и возбужденном состояниях; б) окружающие молекулы имеют высокий дипольный момент; в) подвижность окружающих молекул (текучесть среды) и время жизни возбужденных молекул τ достаточно велики, чтобы за время жизни возбужденного состояния молекулы среды успели переориентироваться.

По сдвигу максимума флуоресценции можно изучать полярность среды. Полярность липидов мембран меняется при разного рода патологиях, поэтому флуоресцентные зонды являются эффективным орудием в медико-биологических исследованиях.

2.9.10 Флуоресцентная микроскопия

Одной из замечательных особенностей люминесцентных методов является возможность наблюдения люминесценции отдельной клетки в флуоресцентном микроскопе. Флуоресцентная микроскопия в настоящее время чрезвычайно распространена. Устройство микроскопа показано на рис. 2.16. Фактически это обычный микроскоп, в качестве источника света используется УФ-лампа. Отличие состоит в наличии специальной светоделительной пластинки, отражающей возбуждающий свет и пропускающей люминесценцию. Использование лазеров (источник когерентного излучения) и компьютерной обработки изображений позволило создать *конфокальный микроскоп*, в котором осуществляется как бы послойный срез живой клетки. Конфокальная флуоресцентная микроскопия получила широкое распространение при исследованиях физиологии клетки.

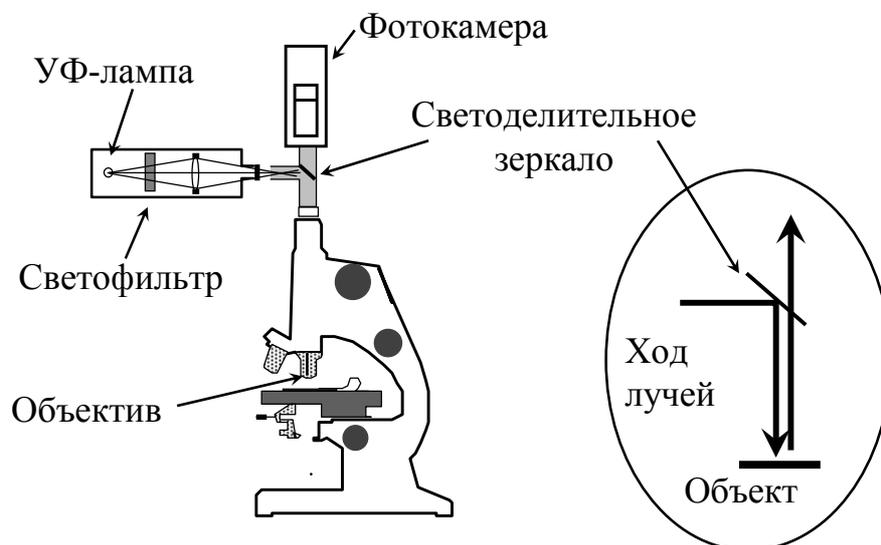


Рис. 2.16. Устройство флуоресцентного микроскопа.

2.10 Хемилюминесценция

Хемилюминесценция – это световое излучение, возникающее в результате химической реакции. Хемилюминесценция испускается одним или несколькими продуктами хемилюминесцентной реакции, образующимися в электронно-возбужденном состоянии. Последующий переход электронов в основное состояние сопровождается эмиссией фотонов (люминесценцией).

Примером хемилюминесценции является излучение, наблюдаемое при рекомбинации катионного радикала АН^+ и сольватированного электрона e^- , образующихся в результате облучения органических хромофоров, содержащих ароматические аминокислоты:

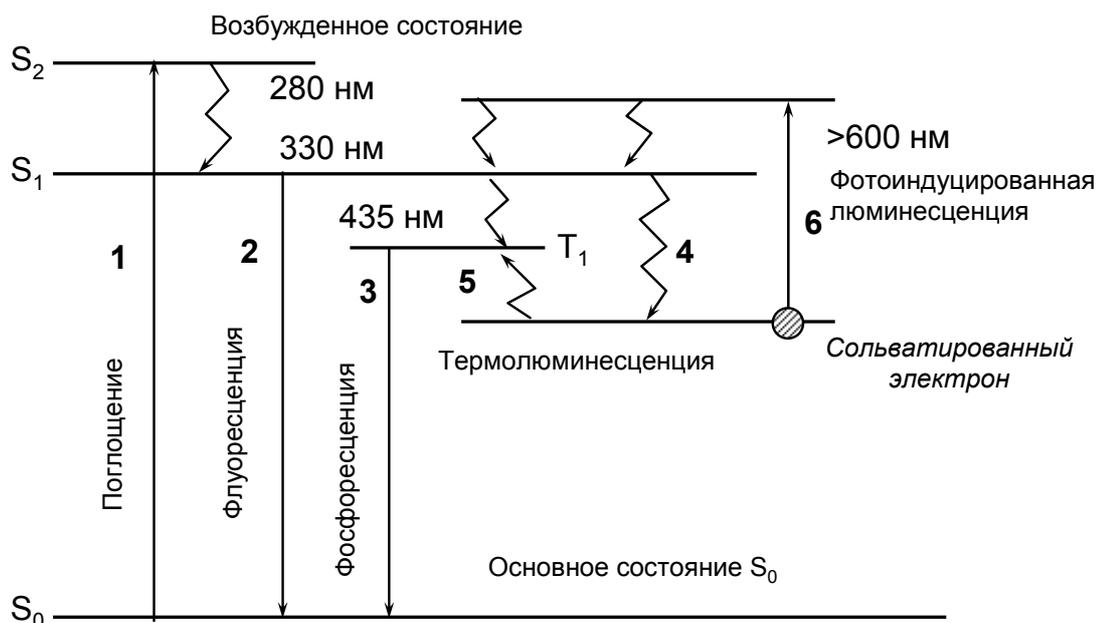


Рис. 2.17. Электронные переходы в молекуле триптофана, сопровождающиеся поглощением фотона (1), флуоресценцией (2), фосфоресценцией (3), фотоионизацией (4), термолюминесценцией (5–3), фотоиндуцированной люминесценцией (6 – 2).

На рис. 2.17 показана схема электронных переходов в реакциях (1) и (2).

Для предотвращения быстрых обратных и побочных реакций первичных фотохимических продуктов исходный раствор ароматической аминокислоты (АН), например, триптофана, замораживают в жидком азоте (77 К), далее облучают УФ светом в полосе поглощения АН (200–300 нм). Под действием УФ излучения электрон переходит на более высокий электронный уровень (переход $S_0 \rightarrow S_1$, стрелка 1). Возврат электрона на основной уровень происходит либо из возбужденного синглетного состояния (S_1), либо из триплетного состояния (T_1), при этом испускаются фотоны флуоресценции (стрелка 2) (300–400 нм) и фосфоресценции (стрелка 3) (400–550 нм), соответственно. Важно, что часть возбужденных молекул диссоциирует на катион-радикал и электрон, окруженный молекулами растворителя (сольватированный электрон). При температуре жидкого азота продукты фотоионизации относительно стабильны, но слабое нагревание предоставляет молекуле энергию, достаточную для перехода сольватированного электрона на триплетный уровень исходной молекулы и последующей термолюминесценции (стрелки 5,3.). Другой способ преодолеть потенциальный барьер – осветить образец, содержащий $\cdot A^+$ и e^- (т.е. предварительно облученный ультрафиолетом) светом с большой длиной волны (>600 нм). Это излучение поглощается сольватированными электронами (стрелка 6). В данном случае исходная молекула может перейти не только в триплетное (как в случае с термолюминесценцией), но также и синглетное возбужденное состояние, сопровождающееся эмиссией фотонов с короткой длиной волны (стрелки 7,2).

Описанные процессы происходят при температурах ниже 100 К. При более высоких температурах (выше 120 К), катион-радикалы высвобождают протон с образованием нейтральных радикалов, имеющих характерные спектры флуоресценции и возбуждения.

2.10.1 Основные стадии хемилюминесцентной реакции

Описанный выше простейший случай люминесценции, сопровождающий химический процесс, демонстрирует тем не менее все особенности других хемилюминесцентных реакций. В общем случае реакция состоит из трех основных стадий:

- 1) Разделение зарядов (в нашем случае $АН \rightarrow \cdot AN^+ + e^-$) с образованием двух заряженных частиц.
- 2) Потребление дополнительной энергии (в данном случае нагревание или освещение, во многих других случаях – окисление кислородом).
- 3) Рекомбинация радикалов с противоположными зарядами с образованием молекулы продукта в возбужденном состоянии.

В более сложных химических реакциях, сопровождающихся фотонной эмиссией, можно различить те же самые три стадии. Одним из важных примеров является

хемилюминесценция люминола под действием активных форм кислорода (АФК) – смеси супероксидных, пероксидных и гидроксильных радикалов. На рис. 2.18 показана схема реакций люминола в присутствии АФК.

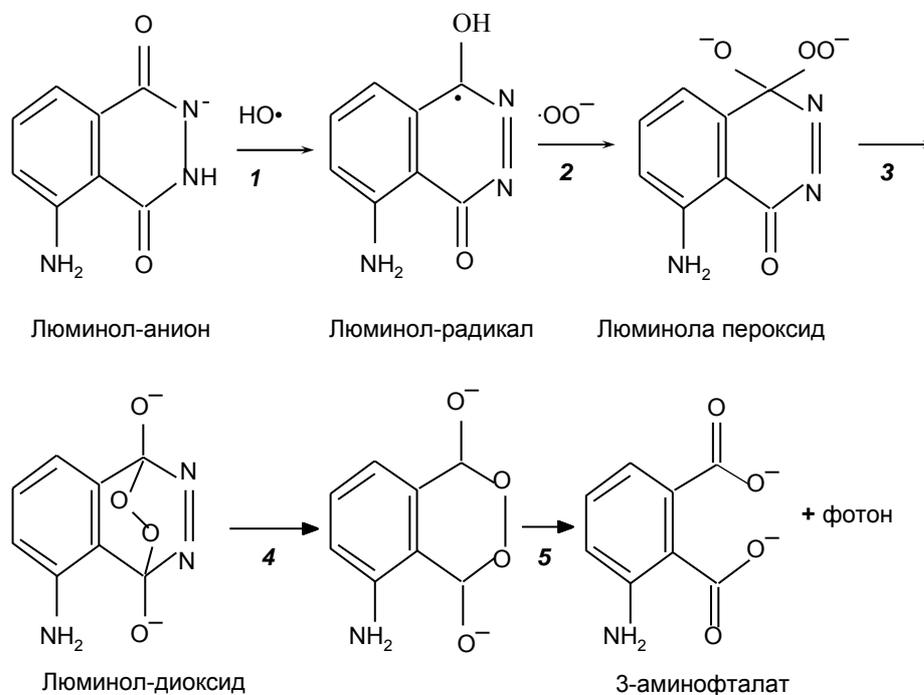


Рис. 2.18. Реакции, вызывающие хемилюминесценцию люминола в присутствии активных форм кислорода. *Объяснение в тексте.*

В реакциях 1 и 2 образуются частицы с разделенными зарядами и возникает избыток энергии за счет присоединения акцептора (ОН) и донора (OO⁻) электрона. Последующая реорганизация молекул (реакции 3–5) заканчивается образованием 3-аминофталата и эмиссией фотона. Очевидно, что схема реакции в случае “специализированного” хемилюминогена люминола гораздо более сложна, нежели чем при взаимодействии между сольватированным электроном и катион-радикалом, но межмолекулярное перемещение электрона для образования возбужденной молекулы является обязательным в обоих случаях.

2.10.2 Эмпирические законы хемилюминесценции и их физический смысл

Анализ энергетики вышеописанных процессов объясняет три эмпирических правила хемилюминесценции, которые справедливы для многих реакций, сопровождающихся низкоинтенсивной люминесценцией.

1. Как правило, спектр хемилюминесценции является аналогом спектра фосфоресценции, а не спектра флуоресценции.
2. Абсолютная величина квантового выхода в хемилюминесцентных реакциях обычно очень мала.
3. Энергия испущенного фотона близка сумме энтальпии реакции и энергии активации, последняя обычно высока (правило Одюбера).

Объяснение правил 1–2 дано на рис. 2.19, правила 3 – на рис. 2.20.

Рассмотрим вероятность излучения с триплетного или синглетного возбужденного уровня.

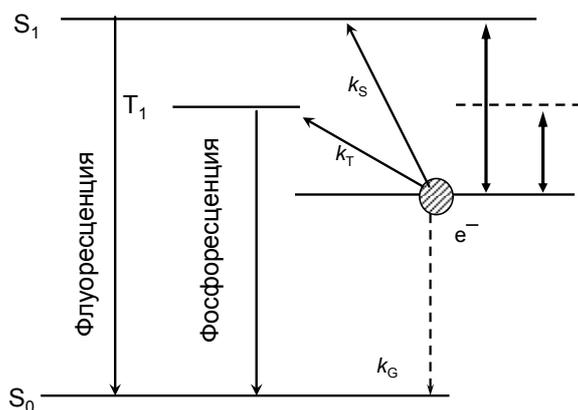


Рис. 2.19. Электронные переходы, сопровождающиеся термолюминесценцией (k_T) и фотолюминесценцией (k_S), безызлучательный переход обозначен пунктирной линией (k_G), e^- – сольватированный электрон.

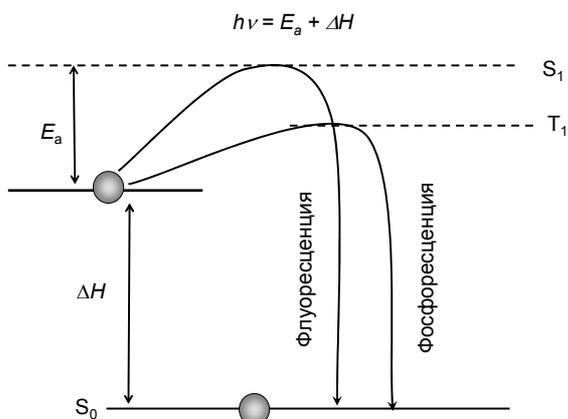


Рис. 2.20. Объяснение третьего правила хемилюминесценции.

Энергия испущенного фотона есть сумма энергии активации люминесценции (E_a) и энтальпии реакции ΔH ; отметим, что энергия активации существенно меньше при электронном переходе через триплетный уровень.

Вероятность образования возбужденных молекул в синглетном и триплетном состояниях (η_S и η_T) определяется соотношением констант переходов в соответствии со следующими уравнениями:

$$\eta_S = \frac{k_S}{k_S + k_T + k_G} \quad (2.8)$$

$$\eta_T = \frac{k_T}{k_S + k_T + k_G} \quad (2.9)$$

где k_G – константа скорости безызлучательной релаксации, k_S , k_T – константы скорости переходов, сопровождающихся фото- и термолюминесценцией, соответственно:

$$k_S = k_{S_0} e^{-\Delta E_S / kT} \quad (2.10)$$

$$k_T = k_{T_0} e^{-\Delta E_T / kT} \quad (2.11)$$

где ΔE_S и ΔE_T – энергии активации соответствующих переходов, а T – абсолютная температура.

Соотношение

$$\frac{\eta_T}{\eta_S} = \frac{k_{T_0}}{k_{S_0}} \cdot e^{(\Delta E_S - \Delta E_T) / kT} \quad (2.12)$$

показывает относительный вклад эмиссии из триплетного состояния (фосфоресценции) и синглетного состояния (флуоресценции). Например, триптофан имеет максимум флуоресценции 280 нм, а основной максимум фосфоресценции при 435 нм. Энергия

фотонов рассчитывается по уравнению $E = h\nu = hc / \lambda$ (h – постоянная Планка, c – скорость света, λ – длина волны фотона). Расчеты показывают, что разность между энергиями синглетного и триплетного состояний $\Delta E_S - \Delta E_T$ для триптофана составляет $136,68 kT$ при $77 K$ и $35,08 kT$ при $27^\circ C$. Соотношение вероятностей испускания фотона при переходах из триплетного и синглетного состояний (уравнение (2.12)) равно

$$\frac{\eta_T}{\eta_S} = \frac{k_{T_0}}{k_{S_0}} \cdot 2,3 \cdot 10^{59}. \quad (2.13)$$

при $77 K$ и

$$\frac{\eta_T}{\eta_S} = \frac{k_{T_0}}{k_{S_0}} \cdot 1,7 \cdot 10^{15}. \quad (2.14)$$

при $300 K$.

Заметим, что не зависящая от температуры и энергии константа перехода между двумя уровнями (предэкспоненциальный множитель) обратно пропорциональна времени жизни возбужденного состояния (т.е. длительности свечения). Для ароматических аминокислот соотношение длительности фосфоресценции и флуоресценции имеет порядок величины 10^8 при $77 K$, и маловероятно, чтобы это значение при комнатной температуре было больше. Принимая во внимание это рассуждение, вероятность эмиссии через триплетное состояние при комнатной температуре все равно будет в $1,7 \cdot 10^7$ раз выше, чем через синглетное возбужденное состояние. Таким образом можно объяснить эмпирическое правило № 1.

Та же самая схема (рис. 2.19) объясняет низкий квантовый выход хемилюминесценции. Известно, что квантовый выход хемилюминесценции η_{CL} является произведением квантового выхода возбуждения (η_T и η_S) и эмиссии, причем последний равен квантовому выходу фотолюминесценции (фосфоресценции и флуоресценции – η_{ph} и η_f). На основании вышеизложенного можно принять во внимание только η_T и η_{ph} .

$$\eta_{CL} = \eta_T \cdot \eta_{ph} \quad (2.15)$$

Обе величины в правой части очень малы. При $77 K$ квантовый выход фосфоресценции для ароматических и гетероциклических веществ может приближаться к единице, а при комнатной температуре он обычно составляет от 10^{-4} до 10^{-5} . Квантовый выход возбуждения также очень низок из-за конкуренции между излучательными и безызлучательными переходами (k_T и k_G). Так как для излучательного процесса требуется преодолеть сравнительно высокий барьер энергии активации, а для

безызлучательного процесса этого не требуется, $k_T \ll k_G$, и квантовый выход возбуждения

$$\eta_T = \frac{k_T}{k_S + k_T + k_G} \approx \frac{k_T}{k_T + k_G} \ll 1 \quad (2.16)$$

Рассмотрим третье правило хемилюминесценции, заключающееся в том, что энергия эмитированных фотонов представляет собой сумму энергии активации хемилюминесценции (E_a) и энтальпии химической реакции (ΔH). Это правило очевидно иллюстрируется схемой на рис. 2.20.

Разобранная простейшая хемилюминесцентная реакция – рекомбинация катион-радикала и сольватированного электрона – объясняет основные особенности гораздо более сложных химических реакций, сопровождаемых эмиссией света.

В заключение перечислим основные виды хемилюминесценции, наблюдаемые в живых системах.

Биолюминесценция является частным случаем хемилюминесценции, связанным со специфическими ферментативными реакциями, происходящими в живых организмах (свечение некоторых насекомых, морских организмов и др.). **Митогенетические лучи** – очень слабое ультрафиолетовое излучение клеток, которое индуцирует деление окружающих клеток – впервые были обнаружены А.Г. Гурвичем. **Сверхслабое свечение (собственная хемилюминесценция)** клеток и тканей) практически всегда сопровождает процессы жизнедеятельности. Этот вид хемилюминесценции в большинстве случаев отличается крайне низкой интенсивностью, однако некоторые вещества, которые в отечественной литературе принято называть активаторами хемилюминесценции (в англоязычной литературе используется термин *enhancer*), обладают способностью усиливать хемилюминесценцию, иногда во много тысяч раз. Такая хемилюминесценция называется активированной. И наконец, слабое свечение возникает при образовании свободных радикалов при действии ряда физических факторов на объект: при облучении ионизирующей радиацией (радиохемилюминесценция), после облучения ультрафиолетом или видимым светом (фотохемилюминесценция), при пропускании электрического тока (электролюминесценция), при действии ультразвука (сонолюминесценция), при воздействии сил трения (триболюминесценция).

2.11 Собственная хемилюминесценция (сверхслабое свечение)

2.11.1 История изучения

Самыми ранними исследованиями способности живых клеток испускать свет были наблюдения древних ученых видимого излучения светлячков и некоторых микроорганизмов (биолюминесценция). В 1924 году российский ученый Александр Гурвич указал на существование чрезвычайно слабого ультрафиолетового свечения

живых клеток – *митогенетических лучей* – которое, как предполагалось, было способна стимулировать деление клеток.

Однако проведение современных научных исследований стало возможным при помощи высокочувствительных детекторов света – фотоэлектронных умножителей (ФЭУ), сильно охлажденных для снижения темновой фотокатодной эмиссии электронов и, следовательно, для улучшения чувствительности. Новаторская работа в этой области принадлежит Стрелеру с соавт., которые в своих исследованиях зеленых листьев использовали фотоумножитель, охлажденный жидким азотом, работающий в режиме счета фотонов.

В работе итальянских ученых использовался фотоумножитель с большим фотокатодом, охлажденный сухим диоксидом углерода. На примере семян растений они доказали способность тканей растений испускать свет. Пятью годами позже Владимиров и Литвин использовали аналогичный подход, работая с фотоумножителем, охлаждаемым жидким азотом и работающим в режиме счета фотонов (рис. 2.21). Интенсивность свечения клеток и тканей растений и животных была крайне низкой и по этой причине такая люминесценция была названа “сверхслабым свечением”.

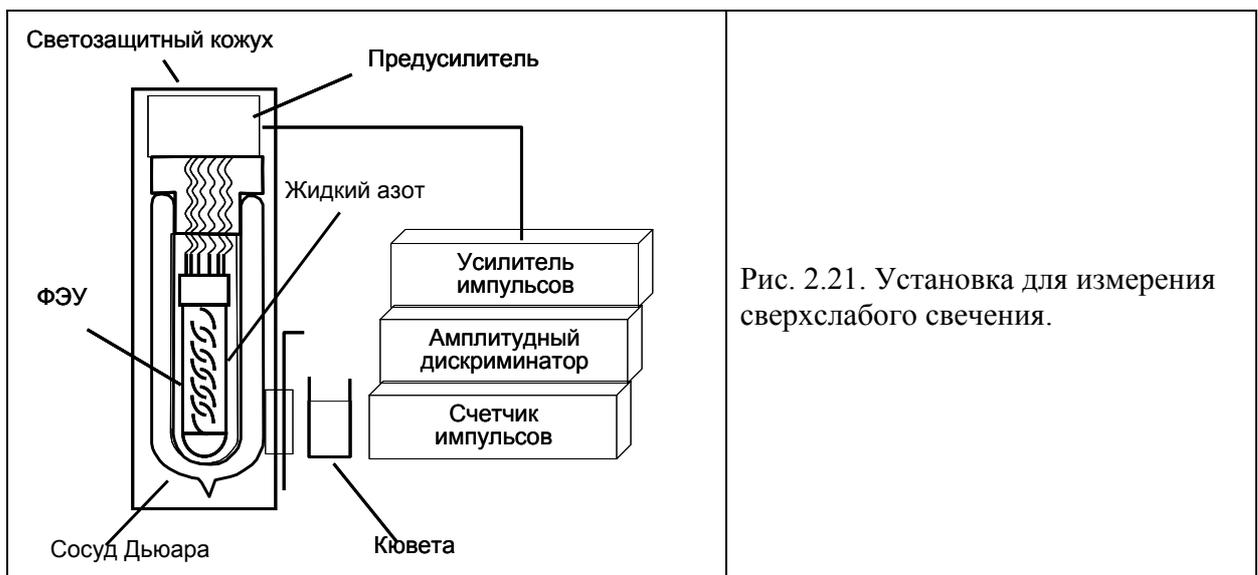


Рис. 2.21. Установка для измерения сверхслабого свечения.

Один из важнейших шагов был сделан Борисом Тарусовым с соавт. в 1961 году. Используя в принципе ту же самую методику, они поместили живую мышь перед фотоумножителем и измерили люминесценцию с поверхности мышинной печени. Было обнаружено, что после облучения животного гамма-лучами люминесценция увеличивалась в несколько раз. Экстракт липидов печени также обнаруживал хемилюминесценцию, при этом интенсивность хемилюминесценции резко увеличивалась после облучения ионизирующими лучами.

Эти исследования положили начало выполнению большой серии экспериментов в различных лабораториях СССР. Период с 1958 по 1972 годы можно назвать “русским периодом” в изучении собственной хемилюминесценции животных клеток и клеточных структур. В 1971 году из двух лабораторий появились независимые сообщения о ферментативной и неферментативной хемилюминесценции в микросомах печени. В период между 1977 и 1983 годами в этой области появилась большая серия научных работ, главным образом из лаборатории Б. Чанса (США)..

2.11.2 Терминология

Используя чувствительные детекторы, ученые смогли обнаружить люминесценцию большого числа различных животных и растительных объектов, например, целой печени, митохондрий и микросом печени, сердца, нервов, мышц, плазмы крови человека, выдыхаемого воздуха человека, асцитной карциномы Эрлиха, и др. объектов. В настоящее время можно утверждать, что все живые клетки и биологические жидкости испускают свет в результате химических реакций, в которых принимают участие свободнорадикальные частицы.

Существует разнообразная терминология, касающаяся описания этой очень слабой люминесценции нормально функционирующих живых клеток. Это свечение называют митогенетическими лучами, сверхслабой люминесценцией, низкоинтенсивной хемилюминесценцией, биофотонной эмиссией и т.д. Можно использовать термин «собственная хемилюминесценция», чтобы подчеркнуть, что это естественный феномен и его можно наблюдать без всякого вмешательства в естественно происходящие процессы в живых объектах.

2.11.3 Хемилюминесценция, сопровождающая перекисное окисление липидов

В 1961 было выяснено, что люминесцирует не только целый орган – печень крысы, но и выделенные липиды этой ткани также обладают хемилюминесценцией, причем интенсивность хемилюминесценции резко возросла после облучения гамма-лучами. Последующие эксперименты показали, что существует тесная связь между интенсивностью хемилюминесценции тканей и выделенных митохондрий и накоплением продуктов перекисного окисления липидов. На рис. 2.22 и 2.23 показан пример корреляции между интенсивностью хемилюминесценции и скоростью накопления продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА). Корреляция между интенсивностью хемилюминесценции и потреблением кислорода показана на рис. 2.24.

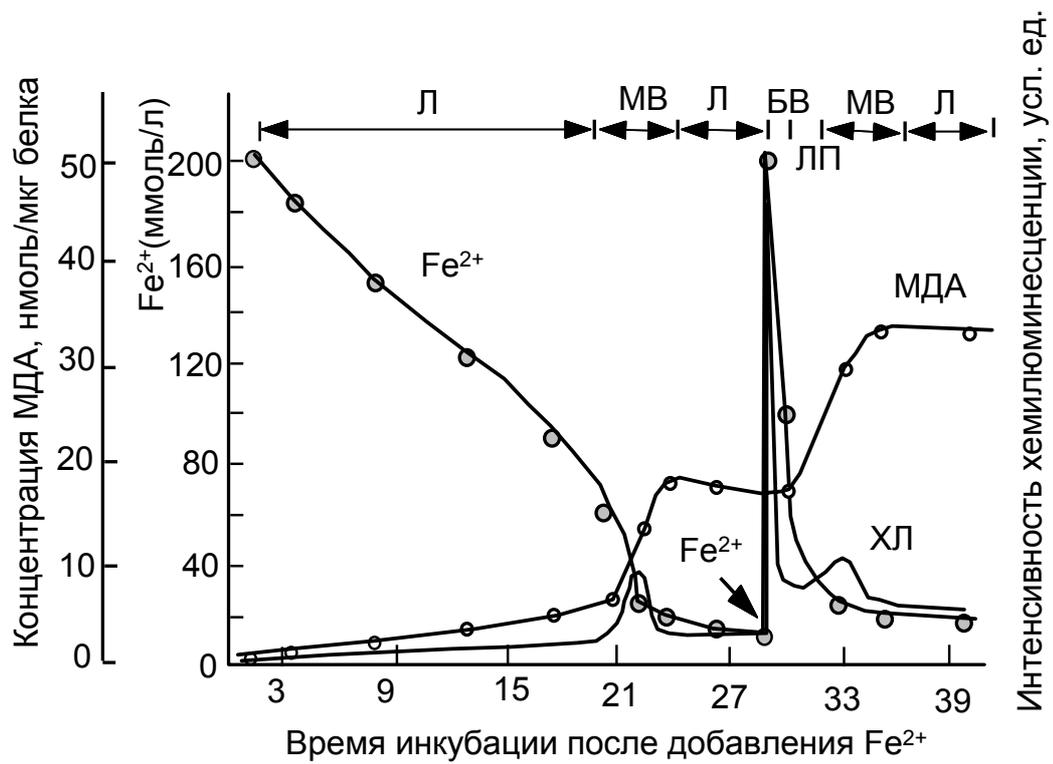


Рис. 2.22. Стадии липидной пероксидации (ЛП) и хемилюминесценции (ХЛ) в суспензии митохондрий, к которым добавлены ионы двухвалентного железа.

МДА – малоновый диальдегид, Л – латентный период, МВ – медленная вспышка, БВ – быстрая вспышка.

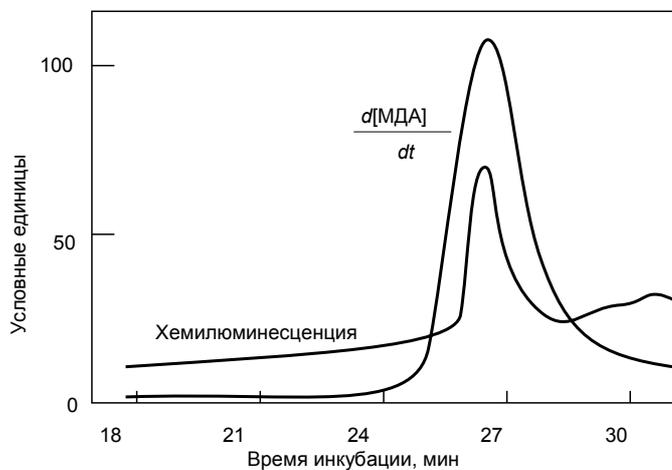


Рис. 2.23. Корреляция между скоростью образования продукта пероксидации (МДА) и интенсивностью хемилюминесценции в суспензии митохондрий.

Рис. 2.23. Корреляция между скоростью образования продукта пероксидации (МДА) и интенсивностью хемилюминесценции в суспензии митохондрий.

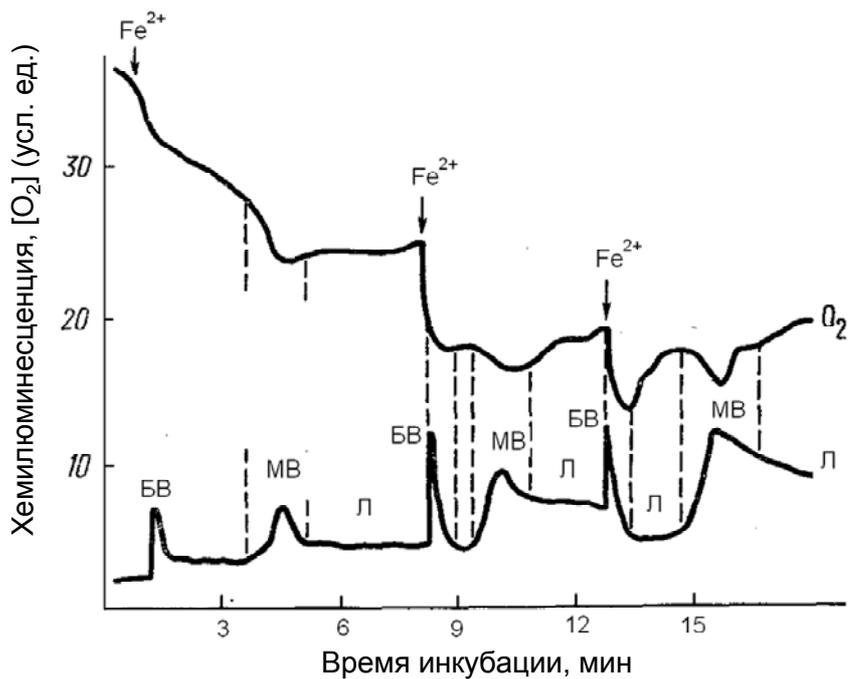


Рис. 2.24. Корреляция между свечением (нижняя кривая) и потреблением кислорода митохондриями (верхняя кривая) в присутствии ионов Fe^{2+}

Стрели - моменты добавления $FeSO_4$. Состав инкубационной смеси: 1 мл суспензии митохондрий в 10 мл 120 мМ NaCl и 5 мМ трис-буфера (pH 7,6), температура $40^{\circ}C$. Остальные обозначения как на рис. 2.22.

Одним из доказательств того, что хемилюминесценция связана с перекисным окислением липидов, является влияние ловушек свободных радикалов на интенсивность хемилюминесценции. Например, было доказано замедляющее действие антиоксиданта α -токоферола на развитие хемилюминесценции в суспензии митохондрий в присутствии ионов двухвалентного железа (рис. 2.25). Опыты *in vitro* и *in vivo* указывают на то, что витамин Е оказывает ингибирующее действие и на хемилюминесцентную реакцию в микросомах.

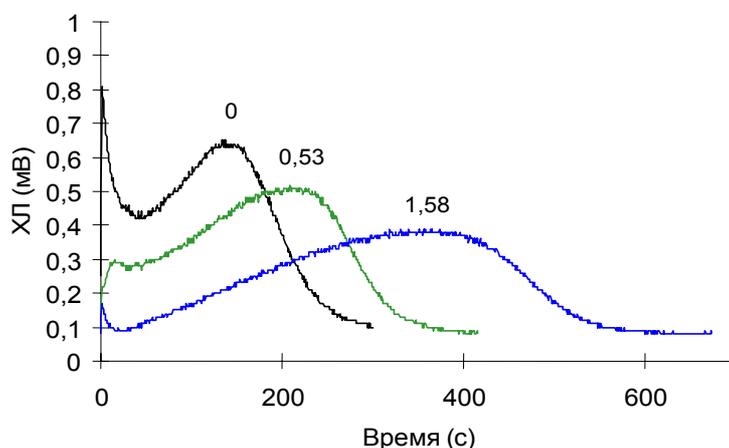


Рис. 2.25. Влияние токоферола на кинетику ХЛ липосом при добавлении к ним ионов Fe^{2+}

Цифры у кривых — концентрация токоферола в мкмоль/л.

Необходимым условием как развития хемилюминесценции так и накопления продуктов перекисного окисления липидов в суспензиях митохондрий или в гомогенатах тканей является присутствие ионов негемового железа. Добавление ЭДТА (этилендиаминтетраацетата натрия) полностью ингибирует и накопление продуктов перекисного окисления, и хемилюминесцентную реакцию (рис. 2.26), в то время как добавление небольших количеств солей железа увеличивает и интенсивность хемилюминесценции, и образование продуктов окисления.

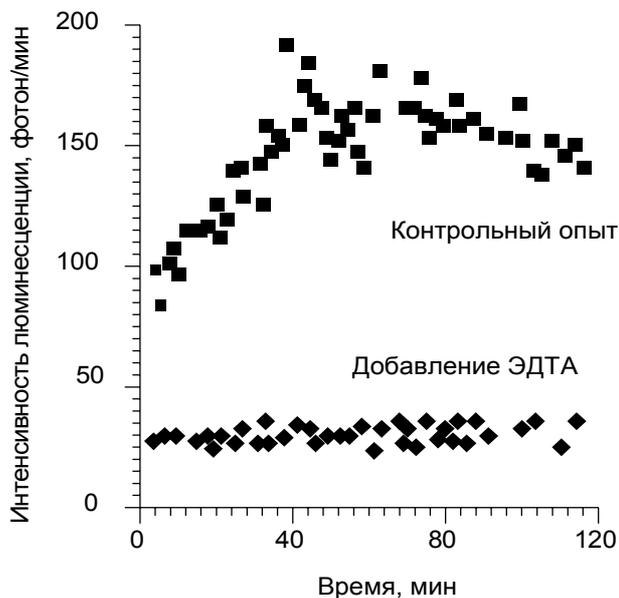


Рис. 2.26. Хемилюминесценция митохондрий печени крысы в присутствии и отсутствии ЭДТА

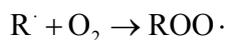
Результаты этих экспериментов можно легко объяснить, исходя из современных представлений о цепном характере окисления липидов; ионы двухвалентного железа разветвляют цепи окисления и тем самым резко ускоряют процесс (см. главу 5.) Существует много областей, в которых успешно применяют измерение собственной хемилюминесценции сопровождающей перекисное окисление липидов; вот некоторые из них:

- 1) Изучение кинетики и механизма цепных реакций перекисного окисления липидов;
- 2) Определение продуктов реакции цепного окисления – гидропероксидов в образце по вспышке хемилюминесценции при добавлении ионов Fe^{2+} ;
- 3) Определение антиоксидантной активности химических веществ (лекарств) и биологических жидкостей (например, плазмы крови);
- 4) Клинические лабораторные исследования.

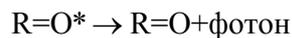
2.11.4 Другие биохимические реакции, ответственные за собственную хемилюминесценцию

При действии активных форм кислорода на белки возникает хемилюминесценция. Одним из природных окислителей при этом может быть пероксинитрит – соединение, образующееся при взаимодействии супероксидного радикала ($\cdot O_2^-$) с монооксидом азота

(·NO). Действительно, в 1995 году было показано, что окисление альбумина бычьей сыворотки пероксинитритом сопровождается хемилюминесценцией. С другой стороны, было обнаружено, что хемилюминесценция, наблюдаемая в перфузируемых легких, является следствием продолжительного окисления белков в перфузионном буфере (в данном случае, 1% альбумин бычьей сыворотки) вследствие образования продукта реакции монооксида азота и супероксид-аниона, по-видимому, пероксинитрита. Механизм хемилюминесценции вероятно заключается в образовании радикалов аминокислот тирозина и триптофана. Реакция начинается с отщепления атома водорода от ароматического кольца, что приводит к образованию радикала (R·), который, в свою очередь, присоединяет атом кислорода, образуя диоксид-радикал:



Взаимодействие двух радикалов диоксида сопровождается образованием продуктов в электронно-возбужденном состоянии и люминесценцией



На этих схемах R· — алкильный радикал триптофана, ROO· — диоксид-радикал триптофана, R=O* — продукт реакции в возбужденном (триплетном) состоянии, P — прочие продукты.

Суммируем основные химические реакции, ответственные за сверхслабое свечение животных тканей:

- 1) Реакции активных форм кислорода – HOOH (пероксид водорода), OO⁻ (супероксид-радикал), OH· (радикал гидроксила), ¹O₂ (синглетный кислород);
- 2) Свободнорадикальное (цепное, перекисное) окисление липидов – LOOH (гидропероксид), LOO· (диоксид-радикал), LO· (алкоксил радикал);
- 3) Реакции активных форм азота – NO· (нитроксид-радикал), ONOO⁻ (пероксинитрит).

2.11.5 Две реакции, ответственные за перекисное окисление липидов

Изучение кинетики и спектров хемилюминесценции в таких системах, как митохондрии или фосфолипидные мембраны показывает, что свечение связано, вероятно, не с одной, а по меньшей мере, с двумя реакциями. При добавлении к липид-содержащим системам ионов двухвалентного железа развивается сложная система реакций цепного окисления липидов, что проявляется в последовательной смене стадий хемилюминесценции: быстрой вспышки, латентного периода, медленной вспышки, стационарного свечения (см.

рисунки 2.22 и 5.14 в разделе 5.5). Оказалось, что относительный вклад разных стадий, например, медленной вспышки хемилюминесценции и хемилюминесценции стационарного состояния различен в зависимости от биохимического объекта и экспериментальных условий. Обычно медленная вспышка хемилюминесценции была наиболее выраженной в суспензии митохондрий (рис. 2.22), менее выраженной в липосомах, и практически незаметной в плазме крови. В последнем случае медленная вспышка наблюдалась только в присутствии сенсibilизатора, скажем, родамина G. Уже эти факты говорят за то, что существуют не одна, а две различные реакции, сопровождаемые хемилюминесценцией, которые имеют различные квантовые выходы и спектры. Действительно, было обнаружено, что спектры эмиссии хемилюминесценции митохондриями в присутствии Fe^{2+} были различными на стадии быстрой вспышки и стационарной хемилюминесценции (рис. 2.27). То же самое наблюдается в случае липосом. Кинетика хемилюминесценции в эксперименте без светофильтров между кюветой и фотоумножителем характеризуется быстрой вспышкой хемилюминесценции, медленной вспышкой и стационарной хемилюминесценцией. В экспериментах с красным светофильтром ($\lambda > 600$ нм) медленная вспышка не наблюдалась, тогда как стационарная хемилюминесценция оставалась без изменения. Если использовать зеленый светофильтр (<580 нм), то можно увидеть только быструю и медленную вспышки, в то время как стационарная хемилюминесценция практически отсутствует. Эти данные, а также тот факт, что продукты перекисного окисления липидов накапливаются только на стадии медленной вспышки, показывают, что цепные реакции сопровождаются излучением *зеленого* света (медленная вспышка), в то время как последующие реакции первичных продуктов перекисного окисления, сопровождаются *красной* люминесценцией (стационарная хемилюминесценция).

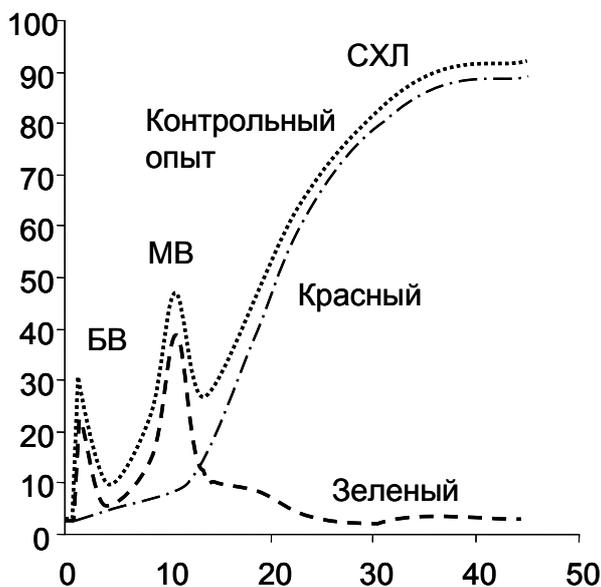


Рис. 2.28. Изменение кинетики хемилюминесценции митохондрий при использовании различных светофильтров. БВ – быстрая вспышка; МВ – медленная вспышка; СХЛ – стационарная хемилюминесценция (плато); светофильтры – зеленый и красный

2.11.6 Усиление хемилюминесценции сенсibilизаторами

Такая ситуация осложняет интерпретацию результатов, полученных с помощью метода хемилюминесценции. Единственным радикальным решением данной проблемы представляется использование селективных активаторов (усилителей) хемилюминесценции. Для этой цели можно использовать люминол, бромзамещенные углеводороды, порфирины, ионы редкоземельных металлов и различные красители. *Люминол* – это широко распространенный хемилюминогенный зонд для свободных радикалов кислорода. В реакции разложения перекиси водорода ионами железа (реакция Фентона) люминол увеличивает интенсивность хемилюминесценции в более чем на четыре порядка величины. Он также усиливает хемилюминесценцию, вызванную окислением ксантина ксантиноксидазой, на два порядка величины. Будучи довольно мощным активатором, люминол, к сожалению, обладает низкой селективностью. В его присутствии хемилюминесценция наблюдается не только при реакциях радикалов кислорода, но и в реакциях липидных радикалов. Так, например, в подвергнутых перекисному окислению митохондриях или липосомах люминол увеличивает интенсивность хемилюминесценции в несколько десятков раз, хотя он оказался практически неактивным в реакции перероксидации жирных кислот, катализируемой ферментом липооксигеназой.

Поскольку люминол, как и другой краситель, люцигенин, участвуют в химических превращениях, которые сопровождаются хемилюминесценцией, их можно назвать химическими активаторами хемилюминесценции. По механизму своего действия они принципиально отличаются от физических активаторов, называемых иногда

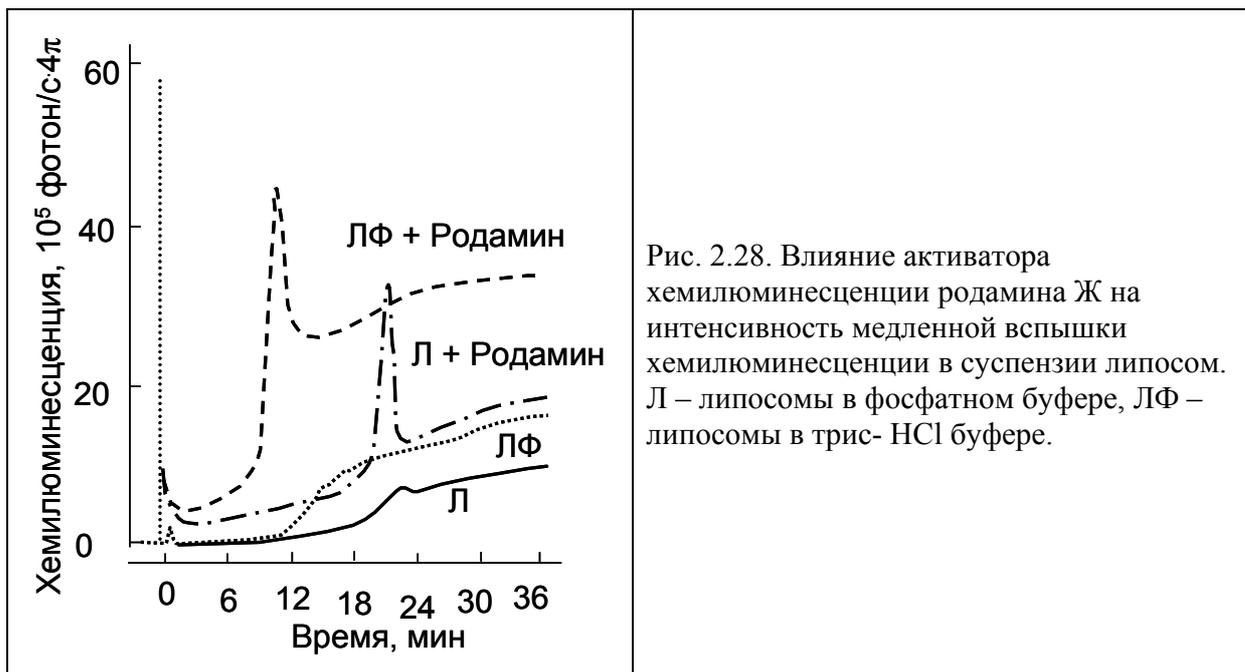
сенсibilизаторами, которые усиливают интенсивность хемилюминесценции, не вступая в химические реакции в изучаемой системе.

Наиболее эффективными физическими активаторами хемилюминесценции оказались некоторые порфирины, например, протопорфирин IX, комплекс европий-тетрациклин, краситель родамин G и некоторые производные кумаринов. Все эти соединения

повышают интенсивность хемилюминесценции при цепном окислении липидов на стадии медленной вспышки свечения. В качестве первичного возбужденного продукта хемилюминогенной реакции при перекисном окислении липидов является возбужденная молекула кетона либо синглетный кислород. Так порфирин бактериофеофорбид, который, как известно, взаимодействует с синглетным кислородом, увеличивает интенсивность хемилюминесценции на стадии медленной вспышки более чем в 20 раз, не оказывая при этом никакого значительного влияния на кинетику хемилюминесценции и накопление малонового диальдегида.

Мощным активатором оказался стехиометрический комплекс Eu^{3+} с антибиотиком тетрациклином (Eu-T). В подвергнутых перекисному окислению липосомах он увеличивает интенсивность хемилюминесценции в более чем на три порядка величины, намного сильнее многих других изучавшихся соединений, включая люминол. В реакции ферментативного окисления линолевой кислоты липооксигеназой комплекс Eu-T служит, в отличие от люминола, мощным усилителем хемилюминесценции. С другой стороны, Eu-T оказался абсолютно неэффективным в реакции Фентона. Поскольку максимумы люминесценции люминола (<590 нм) и Eu-T (>600 нм) расположены далеко друг от друга, излучение этих веществ можно разделить при помощи светофильтров. Тем самым, используя смесь люминола и Eu-T, можно одновременно следить за кислородными радикалами в водной фазе и липидными радикалами в гидрофобной фазе биологических мембран или липопротеинов крови.

Краситель *родамин G* также является достаточно эффективным усилителем хемилюминесценции. Интенсивность хемилюминесценции липосом на стадиях быстрой и медленной вспышек возрастает в присутствии родамина в 15–20 раз (рис. 2.28). В случае образцов плазмы крови родамин G усиливает хемилюминесценцию почти в 20 раз, главным образом, на стадии медленной вспышки ХЛ, во время которой происходит интенсивное протекание цепных реакций перекисного окисления липидов усиливаемых ионами двухвалентного железа. Важным является то, что этот краситель не влияет на кинетику реакции, а также не влияет на количество накопленного к концу процесса продукта перекисного окисления (TBARS). Спектр хемилюминесценции в присутствии этого красителя идентичен спектру фотолюминесценции, и можно предположить, что механизмом эффекта усиления служит перенос энергии электронного возбуждения.



Наиболее мощными и селективными активаторами хемилюминесценции, связанной с перекисным окислением липидов, могут служить лазерные красители – производные кумарина. Усиливающее действие кумаринов было обнаружено случайно, в экспериментах, в которых изучалось антиоксидантное действие новых производных кумарина. Дальнейшее систематическое изучение большого числа производных кумарина, используемых в качестве лазерных красителей, выявило несколько очень мощных усилителей. Строение некоторых кумариновых сенсбилизаторов представлено на рис. 2.29.

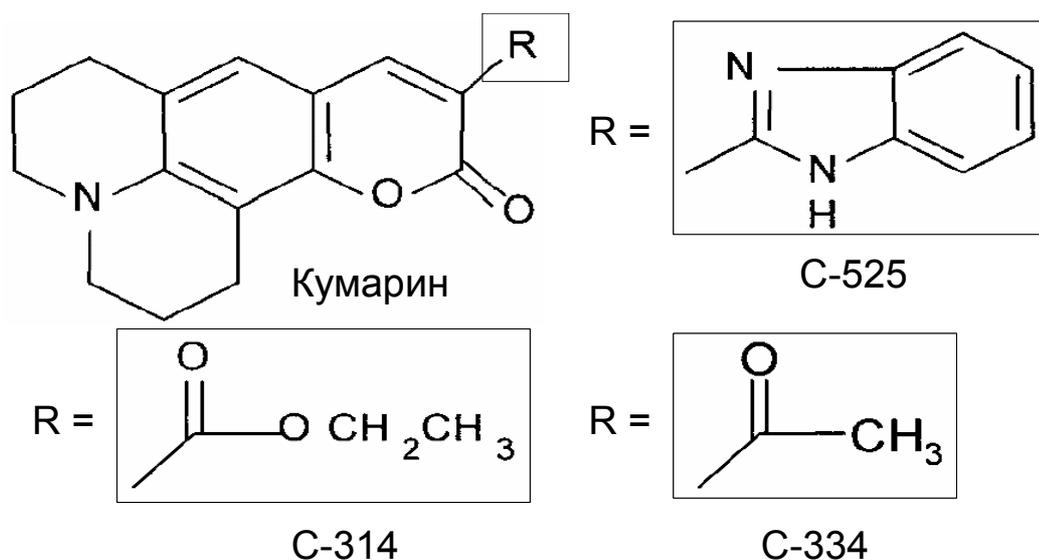
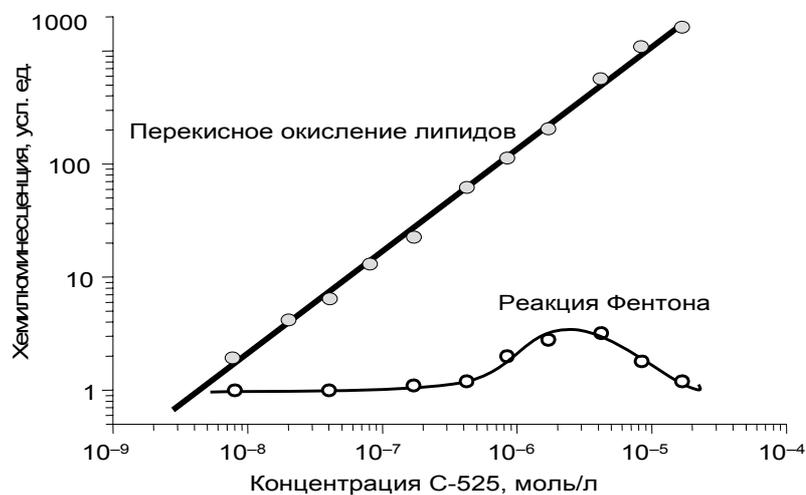


Рис. 2.29. Химическое строение некоторых кумариновых сенсбилизаторов

Было обнаружено, что одно из производных кумарина, вещество Q-525, увеличивает интенсивность хемилюминесценции при перекисном окислении липидов 1600 раз!. В то же самое время это вещество практически не влияло на хемилюминесценцию в реакции Фентона (рис. 2.31).



Следовательно, этот краситель является *селективным* усилителем хемилюминесценции, связанной с реакциями перекисного окисления липидов.

Очень важно, что кумарины, хотя и увеличивают интенсивность хемилюминесценции, не изменяют кинетику реакции (рис 2.32) и не влияют на количество накопленного во время реакции малонового диальдегида. Это значит, что кумарины, такие как С-525, С-510 и т.д., являются “физическими усилителями”, или “сенсбилизаторами” люминесценции, действие которых основывается на явлении переноса энергии электронов с возбужденной молекулы продукта на невозбужденную молекулу красителя (рис. 2.33).

Дело в том, что квантовый выход эмиссии для возбужденного кетона очень низок (обычно порядка 10^{-4}), в то время как для флуоресцентного красителя кумарина эта величина существенно выше (около 10^{-1}). В результате переноса энергии происходит тысячекратное увеличение интенсивности хемилюминесценции. Максимальное наблюдаемое усиление хемилюминесценции веществом С-525 равнялось 1650.

У физических усилителей, таких как С-525, имеется три достоинства.. Прежде всего, они очень существенно увеличивают интенсивность хемилюминесценции, следовательно, дают возможность измерять хемилюминесценцию в малых количествах биологического материала. Вторым достоинством является *селективность* усиления. В отсутствие сенсбилизаторов хемилюминесценция в липидсодержащих системах, как уже говорилось, является результатом по крайней мере двух различных реакций, обеспечивающих фазы медленной вспышки и стационарной хемилюминесценции. В присутствии С-525 усиленная хемилюминесценция характеризуется только фазами быстрой и медленной вспышки без всяких признаков стационарной хемилюминесценции (рис. 2.32).

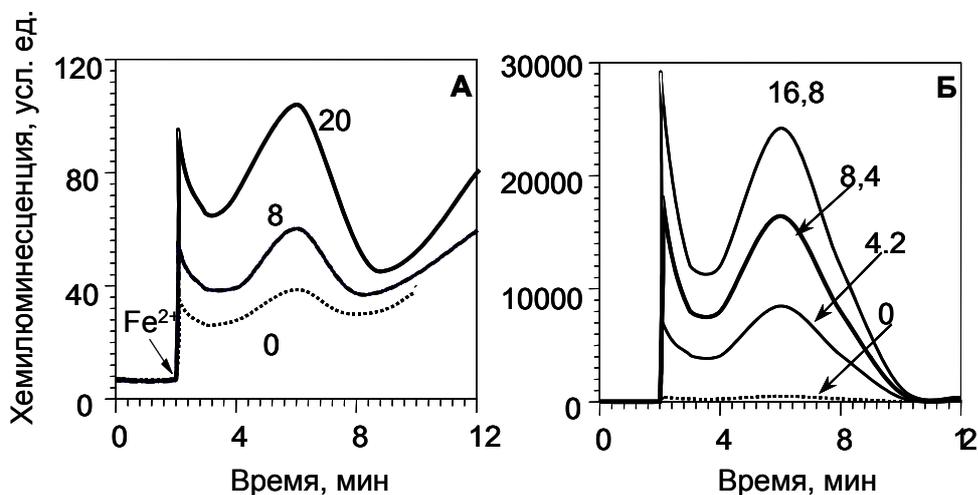


Рис. 3.32. Усиление хемилюминесценции липосом кумарином С-525 (медленная вспышка) в присутствии ионов Fe^{2+} , цифры у кривых показывают концентрацию кумарина, нмоль/л (А) и мкмоль/л (Б).

Под действием Fe^{2+} на липосомы начинается цепное перекисное окисление липидов мембран. В результате возникает хемилюминесценция: появляются быстрая вспышка, минимум хемилюминесценции, медленная вспышка и стационарный период (рис. 2.32а). В присутствии кумаринового красителя С-525, амплитуда быстрой и медленной вспышек увеличивается (рис. 2.32б), в то время как стационарная часть не меняется. При более высоких концентрациях красителя стационарная хемилюминесценция вообще становится незаметной.

Наконец, очень важно и то, что физические сенсibilизаторы не участвуют в реакциях свободных радикалов, а следовательно, их применение не сказывается на ходе процессов ни в химических, ни в биологических системах.

2.11.7 Перекисное окисление липидов в живых клетках, обнаруженное с помощью кумаринового красителя С-525

Могут ли физические усилители хемилюминесценции – кумариновые лазерные красители С-314, С-334 и С-525 быть использованы для наблюдения за взаимодействиями липидных радикалов во время перекисного окисления липидов в живых клетках? На этот вопрос не так давно был получен положительный ответ. Было показано, что хинолизин-замещенные кумарины С-525 и С-334 могут интегрироваться в HL-60 клетки и с успехом использоваться в качестве физических усилителей хемилюминесценции, индуцированной жирорастворимым азоинициатором АМВН (2,2'-азобис(2,4-диметил-валеронитрил). На рис. 2.34 видно, что С-525 усиливает хемилюминесценцию в зависимости от концентрации. Другие индукторы цепного окисления: перекись трет-бутила и перекись кумола (более гидрофильные оксиданты), также индуцировали хемилюминесценцию клеток в присутствии кумаринов. При этом было показано, что в используемых концентрациях кумарины не влияют на АМВН-индуцированное перекисное окисление фосфолипидов мембран в HL-60 клетках, а также не расходуются в процессе АМВН-индуцированного оксидативного стресса. Окислительно-восстановительный статус, оцениваемый внутриклеточным содержанием сульфидных групп, после воздействия кумаринов оставался неизменным. Кумарины не оказывали влияния на жизнеспособность HL-60 клеток как в присутствии, так и в отсутствие оксидантов. Поэтому хинолизин-замещенные кумарины можно считать весьма перспективными физическими усилителями хемилюминесценции для изучения свободнорадикального перекисного окисления в живых клетках.

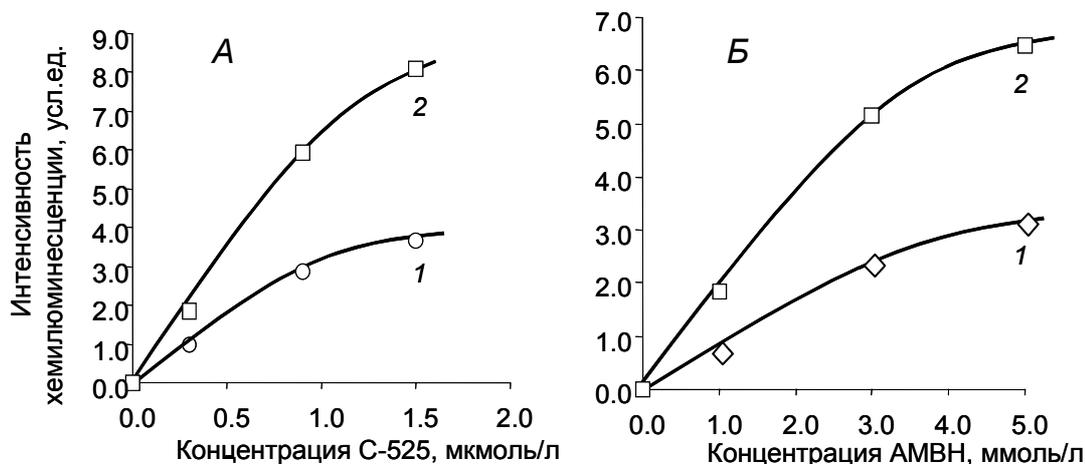


Рис. 2.33. Активация хемилюминесценции в культуре живых клеток HL-60 кумариновым красителем C-525.

A – при разных концентрациях активатора; *B* – при разных количествах AMBH – вещества, инициирующего перекисное окисление липидов в мембранах клеток.

2.12 Практическое применение хемилюминесценции, связанной с перекисным окислением липидов

2.12.1 Определение продуктов перекисного окисления

При добавлении некоторого количества соли двухвалентного железа к суспензии биомембран или липопротеинам крови, содержащим перекиси липидов, наблюдается вспышка хемилюминесценции (быстрая вспышка). При низких концентрациях ионов железа амплитуда этой вспышки пропорциональна концентрации железа, в то время как при высокой концентрации железа наступает насыщение. При избытке ионов железа наблюдается хорошая корреляция между амплитудой вспышки хемилюминесценции и количеством гидроперекисей липидов, определенным методом диеновой конъюгации (рис. 2.34).

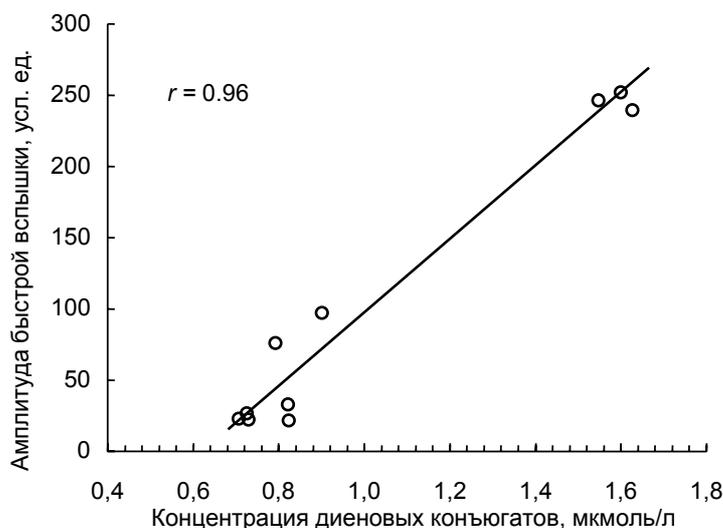


Рис. 2.34. Зависимость амплитуды быстрой вспышки от концентрации продуктов липидной перекиссации в суспензии липопротеинов низкой плотности крови человека.

Линейная зависимость наблюдается между амплитудой быстрой вспышки и концентрацией TBARS (продукта перекисного окисления липидов) в суспензиях липопротеинов низкой плотности (ЛНП). Для липосом была получена линейная зависимость между квадратным корнем амплитуды вспышки хемилюминесценции и концентрацией гидропероксидов в суспензии.

Оксисленные липопротеины крови считаются фактором развития атеросклероза. В этой связи оценка степени перекисного окисления липопротеинов с использованием вспышки хемилюминесценции под действием ионов железа в присутствии С-525 может служить очень полезным методом для клинических лабораторных исследований.

2.12.2 Оценка антиоксидантной активности

Измерение антиоксидантной способности различных встречающихся в природе и синтетических веществ является еще одним примером применения хемилюминесценции. Для этой цели было разработано множество экспериментальных способов – измерение начальной скорости развития хемилюминесценции, определение длительности латентного периода, исследование ингибирования хемилюминесценции, измерение стационарной интенсивности хемилюминесценции и многие другие методики.

Методом хемилюминесценции было исследована антиоксидантная способность множества различных соединений, включая лекарственные препараты (α -токоферол, стероидные гормоны, аскорбиновая кислота, синтетические фенолы, тироксин, производные 1,4-дигидропиридина, синтетические гликофосфолипиды, продукты восстановления кумаринов (аналоги аскорбата), комплексы меди с кумаринами (аналоги супероксиддисмутазы), 3-замещенные кумарины, флавоноиды).

Рассмотрим пример исследования антиоксидантной активности α -токоферола и стероидных гормонов по снижению начальной скорости развития хемилюминесценции. На рис. 2.35 показаны кривые развития хемилюминесценции, полученные для флавоноида ликопина. Обратная концентрация, при которой тангенс угла начального наклона медленной вспышки хемилюминесценции уменьшается в два раза, можно служить в качестве меры антиоксидантной активности данного вещества.

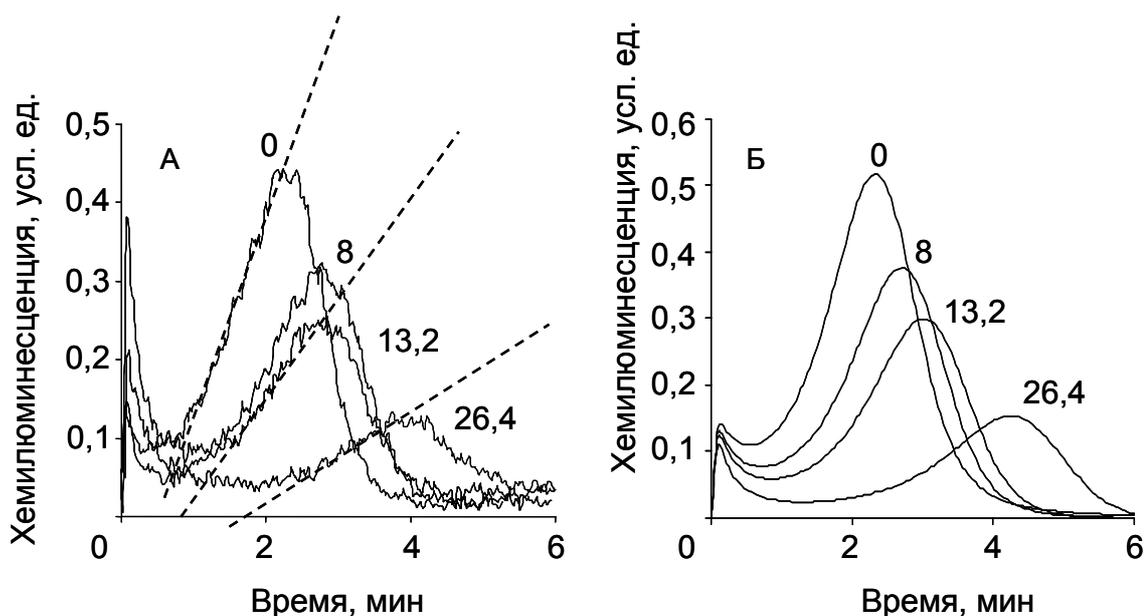


Рис. 2.35. Развитие хемилюминесценции в суспензии фосфолипидов в присутствии Fe^{2+} и ликопина.

A — экспериментальные кривые; *B* — расчетные кривые. Цифры у кривых показывают начальную концентрацию ликопина ($\mu\text{моль/л}$)

Если измерять не относительную активность, а количество антиоксидантов в системе, то достаточно полезным и простым подходом будет определение времени латентного периода — интервала между добавлением продуцирующего радикалы субстрата (например, ионов железа) и наступлением быстрого развития хемилюминесценции (см. рис. 2.37 и 2.38 в качестве примеров).

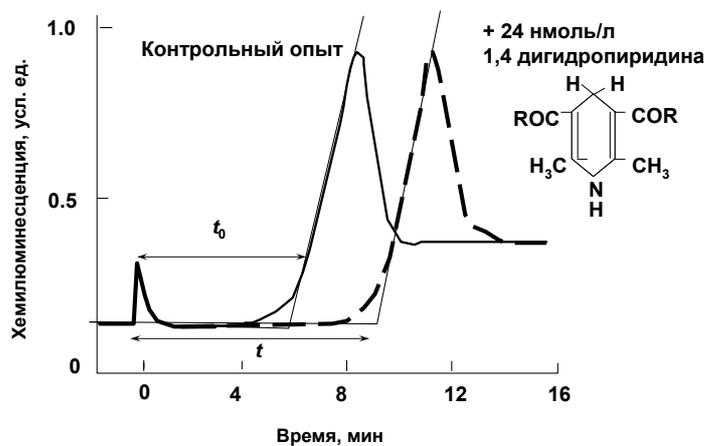


Рис. 2.36. Влияние 1,4-дигидропиридина (формула – справа) на хемилюминесценцию липопротеинов яичного желтка (1).

2 – контрольный опыт, т.е. Без добавления антиоксиданта; t , t_0 – соответствующие латентные периоды реакций

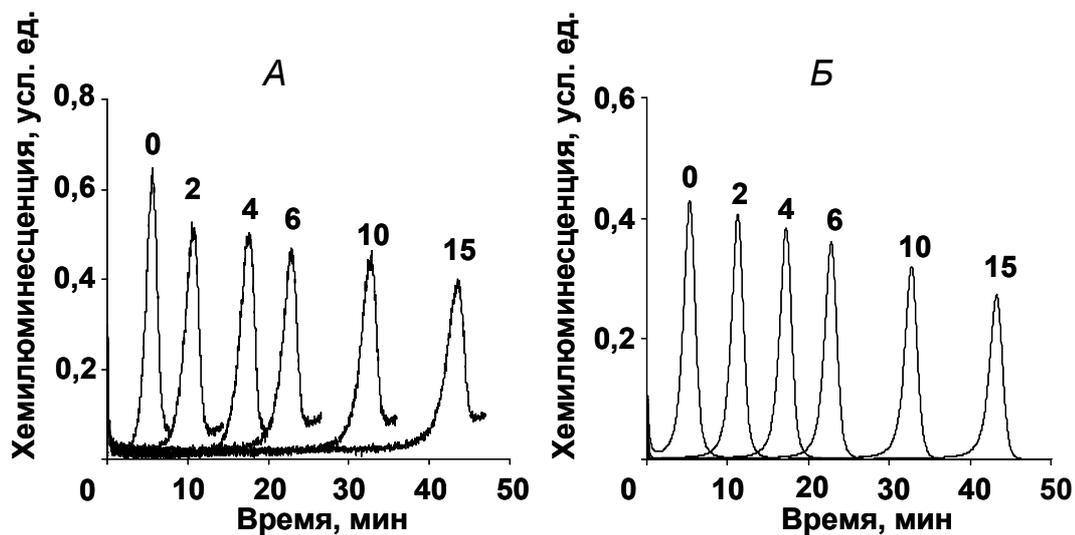


Рис. 2.37. Развитие хемилюминесценции в суспензии фосфолипидов в присутствии Fe^{2+} и аскорбата

A — экспериментальные кривые; *B* — расчетные кривые. Цифры у кривых показывают начальную концентрацию аскорбата

Для определения как количества, так и активности антиоксидантов в течение эксперимента можно использовать ингибирование стационарной хемилюминесценции при добавлении антиоксидантов.

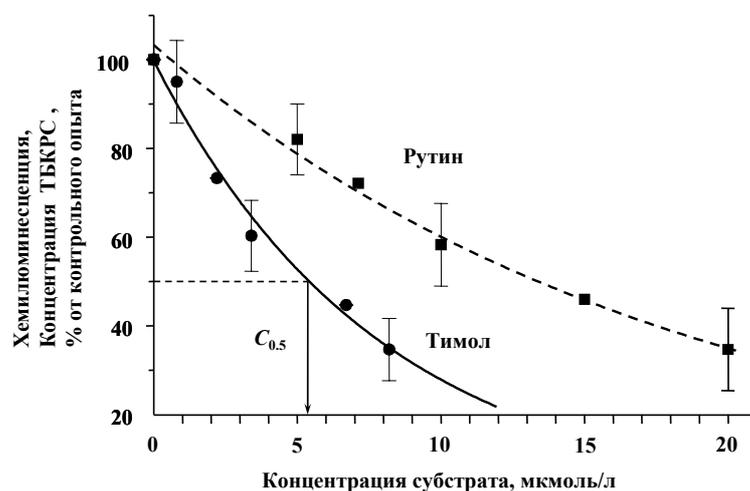


Рис. 2.38. Изменение интенсивности хемилюминесценции при добавлении антиоксидантов – перехватчиков свободных радикалов. ТБКРС – соединения, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (в английской аббревиатуре TBARS)

Однако в большинстве случаев используется самый простой подход: измерение снижения уровня стационарной хемилюминесценции после добавления антиоксиданта к раствору *перед* измерением. Степень снижения интенсивности хемилюминесценции является мерой антиоксидантной активности (см. пример на рис. 2.38). В данном случае, хемилюминесценция суспензии липопротеинов ингибируется двумя антиоксидантами – рутином и тимололом. Обратная концентрация вещества, при которой интенсивность хемилюминесценции уменьшается вдвое, является мерой антиоксидантной активности.

Некоторые исследователи подчеркивают, что существует разница между способностью вещества уменьшать конечное количество липидных перекисей, накапливаемых в системе (*антиоксидантная активность*), и способностью того же вещества снижать скорость свободнорадикальных реакций (*антирадикальная активность*). В системе, содержащей липосомы, к которой добавляли Fe^{2+} , антиоксидантную активность измеряли по снижению интенсивности хемилюминесценции под действием антиоксиданта, добавленного перед проведением эксперимента. Антирадикальную активность измеряли путем ингибирования стационарного состояния хемилюминесценции в течение эксперимента. Антиоксидантную и антирадикальную активность ингибиторов свободнорадикальных реакций исследовали на примере модельных систем: этанол, ионол, мочевиная кислота, супероксиддисмутаза, альбумин. Антиоксидантная и антирадикальная активность данных ингибиторов отличаются друг от друга.

На рис. 2.39 суммированы сегодняшние знания о механизме действия различных антиоксидантов. Данный материал, однако, требует отдельного рассмотрения.

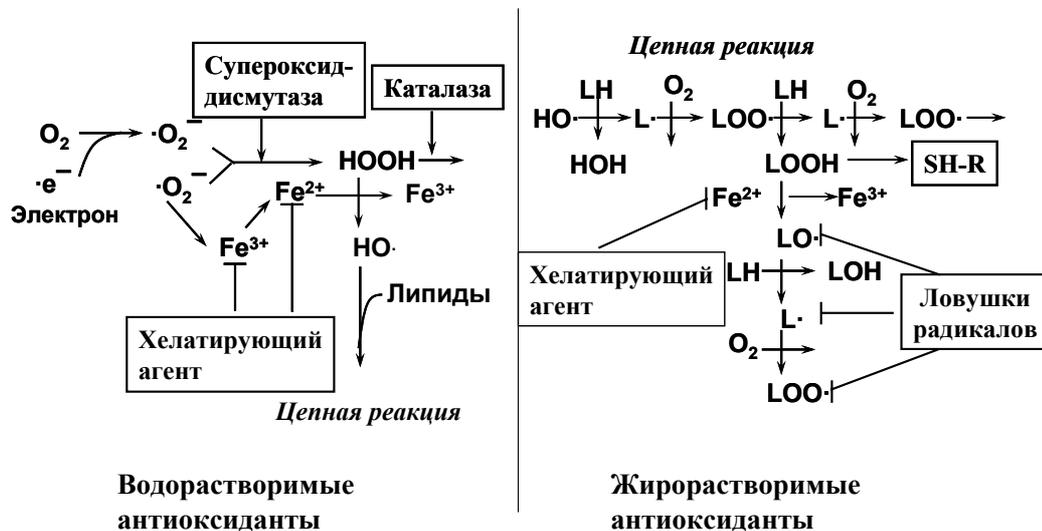


Рис. 2.39. Схема действия водорастворимых и жирорастворимых антиоксидантов

2.12.3 Измерение свечения плазмы крови в целях диагностики заболеваний

В 1967 г. Л. А. Куликовой и независимо А. И. Митрофановым и А. И. Журавлевым было предложено использовать в качестве диагностического теста спонтанную хемилюминесценцию сыворотки и плазмы животных и человека. Примером исследований такого рода может служить изучение спонтанной хемилюминесценции сыворотки крови здоровых людей и больных туберкулезом легких и раком легких, проведенное А. И. Шполянской в 1972г. Было обнаружено, что спонтанная хемилюминесценция больных раком легких (11 ± 2 имп / 10 с) значительно ниже, а больных туберкулезом легких (27 ± 8 имп / 10 с) значительно выше, чем у здоровых людей (18 ± 3 имп / 10 с). В дальнейшем этот метод был модифицирован: сыворотку после помещения в кювету дополнительно освещали УФ-лучами. Было установлено, что у больных злокачественными образованиями УФ-индцированная хемилюминесценция (фотохемилюминесценция) не определяется. У здоровых людей она существует.

Для активации пероксидного окисления липидов в плазме крови (и, следовательно, хемилюминесценции) было предложено использовать пероксид водорода. В частности, было показано, что если принять интенсивность свечения здоровых доноров за 100% (± 7 %), то при тромбозах II степени она составляла $174 \pm 14\%$, а при тромбозах I степени – 283 ± 23 % . Снижение хемилюминесценции в присутствии H_2O_2 наблюдалось также у раковых больных.

Рядом авторов (Ю. М. Лопухин, А. П. Шаров и сотр., 1974; Р. Р. Фархутдинов и Ю. А. Владимиров, 1974) использовалась хемилюминесценция сыворотки, плазмы крови и изолированных липопропротеидов в присутствии солей двухвалентного железа. Светосумма свечения увеличивалась при воспалительных заболеваниях, атеросклерозе и снижалась при ишемических состояниях. На этой основе было также предложено несколько диагностических тестов.

2.13 Хемилюминесценция при активации фагоцитов

В 1972 году Роберт Аллен и сотрудники описали собственную хемилюминесценцию клеток-фагоцитов, которую позднее те же авторы предложили активировать путем добавления люминола или люцигенина. Способностью к фагоцитозу обладают тканевые макрофаги и часть лейкоцитов крови (гранулоциты и моноциты). Эти клетки наряду с фагоцитозом способны к выделению значительных количеств супероксидных радикалов в ответ на действие активирующих стимулов, в качестве которых могут выступать растительные лектины, компоненты оболочек бактерий, частички промышленных пылей (асбеста, кварца и т.д.), некоторые химические соединения и комплексы антиген-антитело. При действии стимула радикально изменяется уровень метаболизма клетки, в частности, происходит резкое увеличение расхода глюкозы и потребления кислорода (дыхательный взрыв). Основная часть потребляемого кислорода восстанавливается до супероксидного радикала в результате реакции:



Собственная хемилюминесценция, сопровождающая процесс образования и неферментативных превращений супероксидных радикалов, имеет низкую интенсивность, но в присутствии люминола хемилюминесценция усиливается.

Наблюдаемое в присутствии люминола свечение связано отчасти с выделением радикалов ($\text{HO}\cdot$ и $\cdot\text{O}_2^-$) (эта составляющая угнетается супероксиддисмутазой), а отчасти – с выбросом клеткой из депо фермента миелопероксидазы и образованием гипохлорита. Эта часть свечения от СОД не зависит.

В настоящее время хемилюминесценция клеток крови и макрофагов довольно широко используется в экспериментальных и клинических лабораторных исследованиях. Рассмотрим некоторые примеры.

1. Регистрируя ХЛ-ответы клеток, можно изучать влияние различных агентов на проницаемость клеточной мембраны для ионов кальция. Дело в том, что вхождение в клетку ионов Ca^{2+} запускает каскад внутриклеточных процессов, заканчивающийся выделением цитомембраной супероксидных радикалов. Например, активация нейтрофилов, сопровождающаяся хемилюминесценцией, вызывается добавлением к клеткам кальциевых ионофоров либо антибиотика полимиксина в сочетании со свободными жирными кислотами (Е. А. Корепанова и сотр., 1986), либо, наконец,

действием импульсов электрического поля достаточной напряженности, которые вызывают электрический пробой липидного слоя мембран (Е. А. Анабердыева и сотр., 1986) (Рис. 2.40).

МЕСТО РИСУНКА И ПОДПИСИ

2. Б. Т. Величковский, Л. Г. Коркина и сотр. предложили метод оценки токсичности промышленных пылей, основанный на изучении ХЛ-ответов перитонеальных макрофагов. Выявление цитотоксичности пылей чрезвычайно важно, так как именно пыль лежит в основе тяжелого профессионального заболевания работников добывающей промышленности – силикоза. Взаимодействие с нетоксическими пылями вызывало слабый и длительный ХЛ-ответ перитонеальных макрофагов. Умеренно токсичные пыли вызывали мощный ответ, т.е. резкий выброс супероксидных радикалов. В этих двух случаях клетки сохраняли жизнеспособность. При добавлении к макрофагам высокотоксических пылей наблюдался очень кратковременный ответ, сопровождающийся исчезновением свечения; клетки при этом погибали. Повторное введение стимула в последнем случае уже не могло привести и не приводило к активации хемилюминесценции.

3. Используя аналогичный подход, но взяв в качестве объекта нейтрофилы из крови пациентов, можно определить индивидуальную чувствительность к пылям у персонала, работающего в контакте с промышленными пылями. Оказывается, ХЛ-ответы клеток различны у разных людей. Можно думать, что у тех, у кого эти ответы значительны, повышена чувствительность к данной пыли.

4. Ответ лейкоцитов крови на действие какого-либо стандартного стимула, например на введение частиц латекса, в ряде случаев может служить диагностическим признаком. При наследственном заболевании – хроническом грануломатозе – нейтрофилы вообще не обладают способностью продуцировать супероксидные радикалы. Такие клетки захватывают микроорганизмы, но последние при этом не погибают и продолжают размножаться. ХЛ-ответ лейкоцитов такого больного вообще отсутствует.

5. Противоположная ситуация – резкая активация хемилюминесцентного ответа – сопровождается появлением в организме человека каких-либо очагов некроза. Так, у больных, перенесших даже очень небольшой инфаркт, ХЛ-ответ лейкоцитов возрастает в 10-20 раз по сравнению с нормой, чего не наблюдается у других больных ишемической болезнью сердца, но не перенесших инфаркт (см. таблицу).

Таблица 9.1. Относительная интенсивность хемилюминесценции лейкоцитарной массы доноров и больных ишемической болезнью сердца.

Группы больных	Интенсивность хемилюминесценции
Доноры	12,7 ± 1,11
Хроническая ишемическая болезнь сердца	43,5 ± 7,92
Инфаркт миокарда	326 ± 47,3

6. Острые воспаления сопровождаются активацией ХЛ-ответов лейкоцитов. При пересадке органов резкая активация ХЛ -ответов наблюдается непосредственно перед отторжением. При хронических воспалениях ХЛ-ответы нейтрофилов и моноцитов снижаются.

7. Весьма перспективно использование перитониальных макрофагов лабораторных животных для обнаружения иммунных комплексов в изучаемом объекте. Как известно, при образовании комплекса антиген–антитело обнажается Fc-фрагмент на поверхности иммуноглобулинов. Макрофаги, как и нейтрофилы, имеют рецепторы к этому фрагменту, поэтому они реагируют на появление иммунных комплексов в окружающей среде выделением кислородных радикалов, что проявляется в виде ХЛ-ответа в присутствии люминола. Если кровь больного уже содержит иммунные комплексы, то добавление сыворотки такого больного к суспензии макрофагов в присутствии люминола сопровождается вспышкой хемилюминесценции. Если в крови содержатся антитела к какому-либо чужеродному материалу (например, к аллергенам), то вспышка хемилюминесценции наблюдается только при одновременном добавлении к макрофагам и антигена (аллергена в нашем случае). Таким образом, можно выявить наличие аллергии к какому-либо лекарству у больного. В других случаях, напротив, используя выделенные антитела к какому-либо веществу, можно обнаружить само это вещество, так как оно даст с антителом иммунный комплекс, который активирует макрофаги.

Таким образом, способность фагоцитов давать ХЛ -ответы на добавление материала, содержащего иммунные комплексы, дает богатые возможности для иммунологических исследований с использованием хемилюминесцентного метода.